



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

**EFEITO REPELENTE DO SUBSTRATO DE DESCARTE DE  
FORMIGAS CORTADEIRAS**

Hosana Haum Barros Mecnas  
Mestrado Acadêmico

São Cristóvão  
Sergipe - Brasil  
Fevereiro/2019

HOSANA HAUM BARROS MECENAS

**EFEITO REPELENTE DO SUBSTRATO DE DESCARTE DE  
FORMIGAS CORTADEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Leandro de Sousa Souto

São Cristóvão  
Sergipe - Brasil  
Fevereiro/2019

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Mecenas, Hosana Haum Barros

M486e      Efeito repelente do substrato de descarte de formigas cortadeiras / Hosana Haum Barros Mecenas; orientador Leandro de Sousa Souto. – São Cristóvão, SE, 2019.  
64 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Ecologia. 2. Formiga cortadeira. 3. Controle biológico. 4. *Atta opaciceps* 5. Manejo. 6. Substrato de descarte. I. Souto, Leandro de Sousa, orient. II. Título

CDU: 591.5

## TERMO DE APROVAÇÃO

**Efeito repelente do substrato de descarte de formigas cortadeiras**

por

**HOSANA HAUM BARROS MECENAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

**APROVADA** pela banca examinadora composta por

---

**PROF. DR. LEANDRO DE SOUSA SOUTO**  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da  
Universidade Federal de Sergipe

---

**PROF.ª DR.ª YANA TEIXEIRA DOS REIS**  
Universidade Federal de Sergipe

---

**PROF. DR. PAULO CESAR DE LIMA NOGUEIRA**  
Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão/SE, 22 de fevereiro de 2019

*“Aos amantes da natureza,  
uma oportunidade de trabalhar por ela.”*

## AGRADECIMENTOS

De tudo que vivi durante esse ciclo que se encerra levo a certeza de que sempre saberei pouco demais, mas sempre terei algo para ensinar além das milhares de coisas para aprender e o mais importante disso tudo, terei coisas boas para contar. Por tudo que o mestrado me trouxe, serei grata, sempre. Para todos aqueles que de alguma forma participaram desse ciclo minha gratidão eterna.

Aos meus pais Carlos e Sara, pela vida, pelo apoio, por acreditar em mim e sempre me incentivar, mesmo quando minha escolha não foi igual ao desejo deles, em especial a minha por jamais deixar de ser alicerce para tudo e todos.

Ao meu irmão Danilo e a minha cunhada Fernanda, juntamente com meus bebês lindos Rafael e Aurora, por todo apoio, alegria do fim de semana e incentivos, por entenderem minha ausência durante o crescimento das crianças.

A minha família e aos amigos que torceram por mim.

Ao meu marido Robson e seus filhos Caio e Léo, por todo apoio e incentivo, por acreditarem que sempre serei melhor e entenderem a minha ausência e estresse.

Aos meus filhos pets por todo amor incondicional, em especial à Pérola que além de tudo era minha companheira de experimentos.

À turma do A, do Amor, Ayslan, Carol (você é sim dessa turma!), Cris, Dryca, Elisa, Flávia, Josy, Léo e Milena, meus juvenis mais lindos, por serem a alegria e doçura dessa fase, por sempre acreditarmos um no outro e estarmos dispostos a ajudar, por não soltar as mãos, que sigamos!

À Rafa, por tudo que construímos da graduação até aqui, por todo apoio e ensinamentos, pelo incentivo, por superarmos juntas as dificuldades diárias e pelo amor fraternal.

Ao Arleu Viana por todas as conversas, incentivos e ideias.

Ao Vinícius Felizola por trazer tanta energia boa para minha vida, ter me presenteado com os ensinamentos do Yoga, tornando meu ano um pouco mais tranquilo, que você possa continuar sendo luz por onde for, hare om!

Aos companheiros de laboratório Letícia, Richard e Michel pelo apoio e incentivo, assim como às amigas do laboratório para a vida, Juci e Camila Nininha, quanta falta vocês fazem por aqui...

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro de Sousa Souto por ter me recebido novamente no mestrado, pelos ensinamentos e incentivo.

À Profa. Dra. Bianca Ambrogi pelos ensinamentos e palavras de apoio e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação e aos nossos professores pela oportunidade e por todos os ensinamentos.

Ao James Cardozo pelo fornecimento de parte do material.

Ao André Luiz Souza da Silva pelo auxílio na manutenção da cultura de couve manteiga e ensinamentos.

À Dra. Andréia Shan pelo apoio, incentivo e disponibilidade para auxílio em análises bioquímicas.

Ao Dr. Genésio Tâmara Ribeiro e toda equipe do Laboratório de Entomologia Florestal (LEFLO) bem como a Dra. Yana Teixeira dos Reis e equipe do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pela ajuda na aquisição do substrato.

Ao Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira e equipe do Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pelo auxílio na condução das análises cromatográficas.

Às professoras Dra. Adriana Bocchiglieri e Dra. Sinara Moreira por terem avaliado este trabalho na fase de Qualificação e auxiliado na melhoria do mesmo.

Aos professores Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira e Dra. Yana Teixeira dos Reis por aceitarem participar da avaliação final deste trabalho na banca de Defesa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À CAPES (PROAP) e CAPES/FAPITEC/Ed.11/2016 (PROEF) pelo financiamento.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa realização ou que torceram por mim!

Que eu possa levar em mim e para onde for energia boa, vontade de ser mais e fazer mais, por mim, pelo próximo, pelo meio; e que assim possamos evoluir. Hare Om!

Aos espíritos de luz por me guiar, abençoar e iluminar!

Serei grata, sempre!

A dissertação está dividida em dois capítulos, apresentados em forma de artigo sendo capítulo 1 intitulado: “Efeito repelente do substrato de descarte de formigas cortadeiras: ação contra as próprias formigas” e será submetido à revista Journal of Applied Ecology e o capítulo 2 intitulado: “Efeito repelente do substrato de descarte de formigas cortadeiras contra o pulgão *Lipaphis erysimi* (L) Kaltenbach, 1843” que será submetido à revista Entomologia Experimentalis et Applicata.



## Sumário

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>11</b>
<b>Efeito repelente do substrato de descarte de formigas cortadeiras: ação contra as próprias formigas.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>Local de estudo e espécies de formigas cortadeiras utilizadas .....</b>	<b>16</b>
2.1 Coleta dos substratos.....	17
2.2 Preparo dos extratos .....	17
2.3 Preparo das iscas atrativas.....	18
2.4 Bioensaios de atratividade com formigas cortadeiras .....	18
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Bioensaios de atratividade com formigas cortadeiras .....	20
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>5. Agradecimentos .....</b>	<b>26</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>30</b>
<b>Efeito repelente do substrato de descarte de formigas cortadeiras contra o pulgão <i>Lipaphis erysimi</i> (L) Kaltenbach, 1843.....</b>	<b>30</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>31</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>32</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>Local de estudo e espécies utilizadas .....</b>	<b>35</b>
2.1 Coleta dos substratos.....	35
2.2 Preparo dos extratos .....	36
2.3 Bioensaio de escolha .....	36
2.4 Análise dos extratos através de cromatografia líquida (HPLC-DAD) .....	38
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 Bioensaio de escolha .....	39
3.2 Análise dos extratos através de cromatografia líquida (HPLC-DAD) .....	40

<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>5. Agradecimentos .....</b>	<b>44</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>48</b>

## RESUMO

Em uma colônia de formigas cortadeiras a produção de resíduos é constante e representa um risco adicional para sua manutenção. O fungo simbiote cultivado por formigas cortadeiras se degrada periodicamente devendo, juntamente com os demais resíduos produzidos, ser descartado em locais apropriados, distantes das áreas de alimentação e reprodução, a fim de reduzir os riscos de contaminação, pois tais resíduos podem abrigar substâncias e microrganismos nocivos para toda a colônia. Desta forma, o descarte de resíduos é feito por meio de câmaras subterrâneas ou pela criação de montículos externos à colônia, dependendo da espécie. Estudos sugerem que, em virtude do odor e natureza do material envolvido, o substrato de descarte pode ser utilizado para impedir o ataque de formigas cortadeiras às plantas. Analisamos experimentalmente se este efeito repelente do substrato de descarte conserva-se em uma solução líquida. Para isso realizamos dois experimentos: primeiro, selecionamos 30 colônias de *Acromyrmex balzani* e 36 colônias de *Atta opaciceps* em campo e ofertamos a cada colônia 30 iscas confeccionadas com canudos e empanadas em polpa cítrica, sendo três tratamentos com 10 iscas para cada. Os tratamentos foram: 1 - “Cont” controle composto por iscas brancas embebidas em solução água/álcool 50%, 2 - “ExtAc” com iscas rosas embebidas em extrato do substrato de descarte de *A. balzani* com concentração de 20% p/v e 3 - “ExtAt” composto por iscas azuis embebidas em extrato com concentração de 20% p/v, com o substrato de descarte de *A. opaciceps*. As iscas ficaram disponíveis às colônias de *A. balzani* por 30 minutos e às colônias de *A. opaciceps* por 20 minutos, sendo contabilizado o tempo e a quantidade de iscas retiradas, comparados através de análise de sobrevivência e LME. No segundo experimento analisamos se discos de plantas pulverizados com o extrato do substrato de descarte inibiriam a alimentação do pulgão *Lipaphis erysimi*. Para tanto, realizamos 103 bioensaios em placas de petri de  $\varnothing = 150\text{mm}$ , com um disco de folha de couve manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) pulverizado com a solução controle (água/álcool) 50% e um disco de folha pulverizado com o extrato do substrato de descarte de *A. balzani* (20%) (n=49) ou do substrato de descarte *A. opaciceps* (n=54), dispostos um de cada lado e liberados 10 pulgões *Lipaphis erysimi* em cada placa, sendo utilizados no total 1.030 pulgões. Os bioensaios foram comparados através de análise binomial. Os resultados mostraram que houve efeito repelente à atividade de forrageamento das formigas, seja por resposta intraespecífica ou interespecífica. Além disso, para ambas as espécies, o extrato de colônias de outra espécie teve um efeito repelente significativamente maior do que o controle. Para pulgões, houve um efeito

repelente com os extratos de ambas as espécies. A tentativa de identificação da composição química dos extratos através de análise cromatográfica não foi elucidativa. Futuros estudos são necessários para verificar se os extratos pulverizados nas folhas em condições de campo têm o mesmo efeito observado nas iscas, bem como as possíveis substâncias causadoras do efeito, a duração do efeito (tanto para formigas quanto para pulgões), culturas a serem protegidas e outras pragas a serem repelidas, assim como outros efeitos.

Palavras-chave: *Acromyrmex balzani*, *Atta opaciceps*, controle, herbivoria, *Lipaphis erysimi*, manejo, resíduo, substrato de descarte.

## ABSTRACT

In a colony of leaf cutting ants the production of waste is constant and represents an additional risk for its maintenance. The symbiotic fungus cultivated by leaf-cutting ants degrades periodically and should be discarded in appropriate places, away from food and reproduction areas, in order to reduce the risk of contamination, as such residues may harbor substances and microorganisms harmful to the whole colony. In this way, the waste disposal is done by means of subterranean chambers or the creation of mounds outside the colony, depending on the species. Studies suggest that the odor and the nature of the disposal material can be used to prevent the herbivory of leaf-cutting ants. We analyzed experimentally if this repellent effect of the nest refuse is conserved in a solution. For this we made two experiments: First, we selected 30 colonies of *Acromyrmex balzani* and 36 colonies of *Atta opaciceps* in the field and offered to each colony 30 baits made with plastic straws soaked in citrus pulp, being three treatments with 10 baits for each. The treatments were: 1 - control "CONT", composed of white baits soaked in 50% water / alcohol solution, 2 - "ExtAc" - pink baits soaked in extract with a concentration of 20% w / v of the *A. balzani* nest refuse and 3 - "ExtAt"; composed of blue baits embedded in 20% w / v extract prepared with *A. opaciceps* nest refuse. The baits were available to the colonies of *A. balzani* for 30 minutes and to the colonies of *A. opaciceps* for 20 minutes, counting the time and the amount of baits removed, compared through survival analysis and LME. In the second experiment we analyzed experimentally if plant discs sprayed with a liquid formulation prepared with the NR produced by the leaf cutting ants *Acromyrmex balzani* and *Atta opaciceps* would repel the feeding of the aphid *Lipaphis erysimi*. For this, we performed 103 choice bioassays in petri dishes ( $\Phi = 150\text{mm}$ ), with a disc of leaf of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. Acephala) with 50% control solution (water / alcohol) and other leaf disc with the NR extract of *A. balzani* (20%) ( $n = 49$ ) or *A. opaciceps* (20%) ( $n = 54$ ). For each petri plate, the discs leaves were disposed on each side and 10 aphids *Lipaphis erysimi* were disposed at the center. The bioassays were compared through binomial analysis. The results showed that: First: there was a repellent effect on the foraging activity of the ants, either for intraspecific or interespecific response. Besides, for both species, the extract from colonies of another species had a significantly higher repellent effect than the control extract. For aphids, there was a repellent effect of the aphids on the NR extracts of both species. The attempt to identify the chemical composition of the extracts by chromatographic analysis was not conclusive. Future studies are needed to verify that extracts sprayed on leaves under field

conditions have the same effect as baits, as well as the possible substances causing the effect, duration of effect (for both ants and aphids), crops to be protected and other pests to be repelled, as well as other effects.

**Key words:** *Acromyrmex balzani*, *Atta opaciceps*, control, handling, herbivory, *Lipaphis erysimi*, nest refuse, residue.

## **CAPÍTULO 1**

### **Efeito repelente do substrato de descarte de formigas cortadeiras: ação contra as próprias formigas**

Hosana Haum Barros Mecnas & Leandro Sousa Souto

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

leandrosouto@ufs.br

## RESUMO

O substrato de descarte produzido por formigas cortadeiras é composto por seu fungo simbiote exaurido, restos de material vegetal e cadáveres de formigas, podendo abrigar substâncias e microrganismos nocivos para as mesmas e seu fungo simbiote, havendo maior risco de mortalidade de operárias que trabalham no descarte e sendo, portanto, evitado o contato com esse resíduo para tentar diminuir os riscos de contaminação nas colônias. Desta forma, estudos sugerem que o substrato de descarte pode ser utilizado para impedir o ataque de formigas cortadeiras às plantas. Analisamos experimentalmente se este efeito repelente do substrato de descarte conserva-se em uma solução líquida. Para isso foram selecionadas 30 colônias de *Acromyrmex balzani* e 36 colônias de *Atta opaciceps* em campo e ofertadas a cada colônia 30 iscas confeccionadas com canudos e empanadas em polpa cítrica, sendo três tratamentos com 10 iscas para cada. Os tratamentos foram: 1 - “Cont” controle composto por iscas brancas embebidas em solução água/álcool 50%, 2 - “ExtAc” com iscas rosas embebidas em extrato com concentração de 20% p/v do substrato de descarte de *A. balzani* e 3 - “ExtAt” composto por iscas azuis embebidas em extrato 20% p/v, preparado com o substrato de descarte de *A. opaciceps*. As iscas ficaram disponíveis às colônias de *A. balzani* por 30 minutos e às colônias de *A. opaciceps* por 20 minutos, sendo contabilizado o tempo e a quantidade de iscas retiradas, comparados através de análise de sobrevivência e LME. Os resultados indicaram haver efeito repelente sobre a atividade forrageadora das formigas, sendo a resposta intraespecífica maior do que a interespecífica para colônias de *Atta*, ou seja, a repelência foi maior com o tratamento ExtAt. O tratamento ExtAt também teve maior eficiência com as colônias de *Acromyrmex*. Entretanto, para ambas as espécies, o extrato oriundo de colônias de outra espécie teve efeito repelente significativamente maior do que o extrato controle. Futuros estudos são necessários para verificar se os extratos pulverizados em folhas em condições de campo apresentam o mesmo efeito do observado nas iscas e a duração desse efeito em condições de campo.

Palavras-chave: *Acromyrmex balzani*, *Atta opaciceps*, controle, herbivoria, manejo, resíduo, substrato de descarte.



## ABSTRACT

The nest refuse produced by leaf-cutting ants is composed of their fungus symbiont, debris of plant material and corpses of ants, and may harbor substances and microorganisms harmful to them and their symbiont fungus, with a higher risk of mortality of workers working at the disposal and thus avoiding contact with this residue to try to reduce the risk of contamination in the colonies. In this way, studies suggest that the disposal substrate can be used to prevent the attack of leaf-cutting ants on plants. We analyzed experimentally if this repellent effect of the nest refuse is conserved in a liquid solution. For this, 30 colonies of *Acromyrmex balzani* and 36 colonies of *Atta opaciceps* in the field were selected and 30 baits made with straws and empanadas in citrus pulp were offered to each colony, being three treatments with 10 baits for each. The treatments were: 1 - "Cont" control composed of white baits soaked in 50% water / alcohol solution, 2 - "ExtAc" with pink baits soaked in extract with a concentration of 20% w / v of the *A. balzani* nest refuse and 3 - "ExtAt" composed of blue baits embedded in 20% w / v extract prepared with the *A. opaciceps* nest refuse. The baits were available to the colonies of *A. balzani* for 30 minutes and to the colonies of *A. opaciceps* for 20 minutes, counting the time and the amount of baits removed, compared through survival analysis and LME. The results indicated that there was a repellent effect on the foraging activity of the ants, and the intraspecific response was higher than the interspecific response for *Atta* colonies, that is, the repellency was higher with the ExtAt treatment. The ExtAt treatment also had greater efficiency with the colonies of *Acromyrmex*. However, for both species, the extract from colonies of another species had a significantly higher repellent effect than the control extract. Future studies are necessary to verify if extracts sprayed on leaves under field conditions have the same effect as that observed in baits and the duration of this effect under field conditions.

Key words: *Acromyrmex balzani*, *Atta opaciceps*, control, herbivory, handling, nest refuse, residue.

## 1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) são herbívoros dominantes, altamente polípagas, sem distinção entre áreas florestais ou agrícolas, levando a danos econômicos, sendo por isso consideradas importantes pragas de sistemas agrossilvopastoris (Holldöbler & Wilson, 1990; Urbas *et al.*, 2007).

Diversos métodos para o manejo de formigas cortadeiras têm sido utilizados, como armadilhas, explosivos, aplicação de inseticidas e fungos entomopatogênicos, porém a maioria apresenta alto custo e efeitos adversos para o meio ambiente e para a saúde humana (Montoya-Lerma *et al.*, 2012; Della Lucia *et al.*, 2013; Zanetti *et al.*, 2014), além de tentar eliminar a colônia desprezando os importantes serviços ecossistêmicos prestados pela mesma, como dispersão de sementes, polinização, regulação e ciclagem de nutrientes (Holldöbler & Wilson, 1990; Del-Toro *et al.*, 2012). Um método de manejo que pode ser aplicado conservando a colônia e que não requer sua localização física é a utilização de substâncias que apresentem efeito deterrente ou repelente, desta forma o manejo pode ser realizado sem a necessidade de procurar a colônia alvo e possibilitando manejar mais de uma colônia ao mesmo tempo. Estes efeitos podem ser entendidos como o efeito de impedir/inibir a manutenção da alimentação ou provocar a reação de locomoção em direção oposta à fonte dessas substâncias, sendo desencadeados por substâncias químicas geralmente liberadas por plantas como metabólitos secundários (Dethier *et al.*, 1960; Lara, 1991).

O efeito repelente foi testado contra o forrageio de formigas cortadeiras utilizando o substrato que as mesmas descartam, que apesar de pouco estudado, é uma importante característica biológica do grupo (Zeh *et al.*, 1999). Este substrato já é considerado um dos principais fatores responsáveis pelas modificações no solo sob influência de colônias, em virtude de seu alto teor de nutrientes, favorecendo o desempenho da vegetação adjacente (Farji-Brener & Illes, 2000; Pirk & Farji-Brener, 2013; Farji-Brener & Werenkraut, 2017). Recentemente, outros estudos relataram sua utilidade como substrato de crescimento para a produção de hortaliças (Santos *et al.*, 2017) e como adjuvante na regeneração vegetal após distúrbios (Cerdeira *et al.*, 2012; Haum, 2017; Santos *et al.*, 2018).

Em virtude da grande quantidade de vegetação forrageada pelas colônias, a produção de material de descarte é uma característica marcante deste grupo. O substrato de descarte é um aglomerado composto de partículas restantes do material vegetal transportado pelas formigas para o interior do ninho, acrescido de restos de formigas mortas e do fungo simbiote não

consumido e degradado. Por se tratar de matéria orgânica em decomposição ou apresentar contaminantes, como fungos competidores, além de substâncias bactericidas e fungicidas produzidas pelas formigas ou pelo processo de degradação, pode se tornar tóxico e por isso é constantemente retirado dos locais onde estão o fungo sadio, a rainha, os ovos e as larvas. Dependendo da espécie de formiga, o substrato de descarte é depositado em câmaras internas da colônia escavadas para essa finalidade ou externamente em área próxima às colônias (Cerdeira *et al.*, 2012) (e. g. *Acromyrmex balzani* Emery, 1890 apresenta câmaras externas e *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 apresenta câmaras internas). A quantidade de substrato de descarte produzido varia entre as espécies, mas estudos sobre o tema estimam em cerca de 20 a 450g de peso seco produzidos diariamente, ou cerca de 750g a 20kg anualmente por cada colônia (Sousa-Souto *et al.*, 2007).

Na colônia há uma separação de funções para as operárias a fim de manter a organização e higiene da mesma. O polietismo temporal separa operárias por idade e condição física por determinadas funções, as menores e mais jovens são destinadas aos cuidados com o fungo e a prole, para as câmaras de descarte e atribuições externas à colônia são destinadas operárias mais velhas ou mais debilitadas, por representarem menor perda para a colônia (Souza *et al.*, 2011).

Estudos relatam que há um aumento na mortalidade de operárias em contato com as câmaras de descarte (Bot *et al.*, 2001; Lacerda *et al.*, 2013) e com isso o contato seria evitado pelas operárias forrageiras (Zeh *et al.*, 1999; Ballari & Farji-Brener, 2006). Desta forma, provavelmente as formigas podem associar o forte odor do material ou alguma outra característica física ou química do substrato de descarte à presença de patógenos, evitando assim seu contato. Paralelamente, diversas substâncias produzidas por glândulas específicas nas formigas atuam na função antifúngica ou bactericida, a exemplo das glândulas mandibular e metapleurar, que estão diretamente relacionadas à higiene das operárias e da colônia (Polisen *et al.*, 2002; Mendonça *et al.*, 2009), outrossim, há relato de que o reservatório da glândula metapleurar possui maior volume nas operárias externas ou do descarte, por executarem atribuições consideradas de maior risco à colônia (Lacerda *et al.*, 2010). Essas substâncias podem permanecer ativas no material de descarte e atuar em favor do combate a organismos contaminantes do fungo simbiote da colônia e até mesmo das operárias.

Uma vez que as formigas evitam o contato do material de descarte em áreas “limpas” da colônia, esse material poderia ser uma alternativa de manejo de formigas cortadeiras em pequena escala em áreas agrícolas. Explorando esses aspectos, estudos anteriores relatam que o substrato de descarte produzido pelas formigas cortadeiras apresenta efeito repelente sobre

sua alimentação, podendo ser um método alternativo de manejo. Para esse fim, foram adicionados montículos do substrato de descarte in natura rodeando as plantas alvo e como resultados os autores observaram que embora o descarte tenha apresentado um efeito repelente, este efeito foi perdido com o tempo (Zeh *et al.*, 1999; Farji-Brener & Sasal, 2003; Ballari & Farji-Brener, 2006), parecendo haver uma perda do efeito repelente de acordo com a conservação do substrato de descarte, ou mesmo por exposição a fatores bióticos e abióticos. Possivelmente, o uso de uma formulação líquida preparada com o substrato de descarte possa apresentar o mesmo efeito repelente.

Diante disso, o presente estudo verificou o efeito repelente do substrato de descarte em formulação líquida (extrato hidroalcoólico), testando o efeito repelente às formigas cortadeiras (intraespecífico e interespecífico *A. balzani* e *A. opaciceps*). Para tanto, o estudo partiu das seguintes hipóteses *i*) uma vez que o substrato de descarte é tóxico e evitado pelas formigas cortadeiras, iscas atrativas preparadas com este substrato poderão também ser evitadas; *ii*) caso iscas tratadas com substrato apresente efeito repelente intraespecífico, poderão também apresentar efeito interespecífico. Para tanto, as premissas das hipóteses foram: *i*) formigas cortadeiras evitarão coletar iscas tratadas com o extrato do substrato de descarte e; *ii*) o efeito repelente será observado independente da origem do substrato (intra e interespecífico).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local de estudo e espécies de formigas cortadeiras utilizadas**

O estudo foi realizado no campus da Universidade Federal de Sergipe em São Cristóvão (10°55'33.55"S 37°6'8.327"W). As espécies foram escolhidas a fim de minimizar custo e tempo de execução do estudo, sendo espécies de fácil acesso dentro das dependências da universidade ou podendo ser mantidas com a estrutura local.

A espécie *Acromyrmex balzani* foi escolhida pela grande abundância de colônias na área de estudo e por possuir ampla distribuição em ambientes perturbados, além de uma alta densidade de colônias nesses ambientes, chegando a 900 colônias/ha (Sousa-Souto *et al.*, 2013) e ter como característica peculiar o descarte do resíduo orgânico externamente ao ninho, na superfície do solo, facilitando a coleta e disposição no ambiente (Farji-Brener & Illes, 2000).

A espécie *Atta opaciceps* foi escolhida por ser facilmente encontrada na área de estudo e áreas urbanizadas de todo o Nordeste brasileiro, formam ninhos tipo murundus de até 2,5m

de altura com numerosas entradas distribuídas radialmente com o amadurecimento da colônia (Delabie *et al.*, 1997).

## **2.1 Coleta dos substratos**

O substrato de descarte produzido por *A. balzani* foi coletado em campo, no local de estudo, nos montículos descartados pelas próprias colônias da espécie, caracterizado como um resíduo de coloração clara em frente à entrada do ninho, sendo recolhido com auxílio de uma colher, depositado em sacos de papel, levado ao Laboratório de Ecologia de Insetos e posto em bandeja de aço inoxidável em estufa a 60°C por 48h com o objetivo de eliminar possíveis patógenos ou contaminantes que possam estar presentes na vegetação utilizada como substrato de forrageio.

O substrato de descarte produzido por *A. opaciceps* foi coletado de 10 colônias mantidas no Laboratório de Entomologia Florestal do Departamento de Engenharia Florestal e por uma colônia mantida no Laboratório de Entomologia no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe. Este substrato é descartado em câmaras dispostas para essa finalidade e apresenta coloração marrom escuro, sendo coletado com auxílio de uma colher, depositado em vasilhame plástico, levado ao Laboratório de Ecologia de Insetos do Departamento de Ecologia da mesma instituição e posteriormente levado em bandeja de aço inoxidável à estufa a 60°C por 48h com o objetivo de eliminar possíveis patógenos ou contaminantes que possam estar presentes na vegetação utilizada como substrato de forrageio.

## **2.2 Preparo dos extratos**

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados seguindo metodologia modificada para calda de fumo a partir de Barbosa *et al.*, (2006).

Foram preparados extratos hidroalcoólicos com concentração de 20% p/v, sendo adicionado 100mL de álcool etílico 100% e 100mL de água destilada a 40g de substrato separadamente para cada espécie, misturado no momento do preparo e duas vezes ao dia, deixado em repouso a temperatura ambiente, finalizando com 48h quando então foram filtrados e armazenados a temperatura ambiente.

### 2.3 Preparo das iscas atrativas

As iscas atrativas eram compostas de canudos coloridos empanados em polpa cítrica, deixados secar e embebidos com solução controle (água destilada/álcool 50%) ou com extrato hidroalcoólico do substrato produzido por ambas as espécies, diferenciados por cor entre os tratamentos (branco – controle (Cont), rosa – extrato *Acromyrmex* (ExtAc), azul – extrato *Atta* (ExtAt)).

### 2.4 Bioensaios de atratividade com formigas cortadeiras

Para o bioensaio com formigas cortadeiras foram selecionadas 30 colônias de *A. balzani* e 36 colônias de *A. opaciceps* nas dependências da Universidade Federal de Sergipe, marcadas com palitos de madeira e seus pontos georreferenciados com auxílio de GPS. Foram identificadas áreas de forrageamento para essas colônias e seguindo metodologia modificada a partir de Moreira & Forti (1999) foram ofertadas 10 iscas artificiais atrativas (por tratamento), totalizando 30 iscas por colônia. Para colônias de *A. balzani* a disposição das iscas foi sorteada por tratamento e dispostas radialmente ao olheiro em forma de montículos de iscas, respeitando a distância de 25cm, seguindo a direção do forrageamento (Figura 1). Para colônias de *A. opaciceps*, a disposição foi paralela à trilha de forrageamento, respeitando uma distância de 2m a partir do olheiro e entre as iscas, a ordem dos tratamentos também foi previamente sorteada (Figura 2). As iscas foram observadas por 30 minutos após primeiro carregamento para colônias de *A. balzani*, já que estas apresentam colônias menores, com menos operárias, com trilha radialmente espalhada, necessitando de maior tempo para se deslocar e carregar as iscas e por 20 minutos após primeiro carregamento para colônias de *A. opaciceps*, sendo contabilizadas as iscas restantes para verificar a preferência ou repelência ao final do experimento, como também anotados os tempos de cada retirada.

O número de iscas restantes entre os tratamentos foi comparado usando modelos lineares de efeitos mistos (LME) a 5% de nível de significância. Nestes modelos, o número de iscas restantes (variável resposta) foi testado por tratamento (tipo de substrato ou controle) por colônia, considerando assim cada colônia como um bloco, já que a mesma recebe os três tratamentos ao mesmo tempo. Além disso o tempo de retirada das iscas entre os tratamentos foi testado utilizando uma análise de sobrevivência (Kaplan-Meier) para verificar se houve



diferença na velocidade de retirada entre os tratamentos a 5% de nível de significância (Crawley, 2007). Os dados foram analisados com auxílio do software R (R Core Team, 2017).



Figura 1. Colônia de *Acromyrmex balzani* evidenciando olheiro da colônia e o depósito de substrato de descarte à esquerda (A). Colônia com iscas dispostas radialmente ao olheiro (B) e detalhe de iscas sendo coletadas pelas formigas (C).



Figura 2. Trilha (parcial) de forrageio de *Atta opaciceps* com iscas dispostas paralelas à trilha e em detalhe iscas sendo coletadas ou visitadas pelas formigas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Bioensaios de atratividade com formigas cortadeiras

Foram observadas respostas similares de repelência para os extratos oriundos de colônias de formigas cortadeiras e esse efeito diferiu significativamente dos extratos controle. Tanto *A. balzani* quanto *A. opaciceps* evitaram as iscas embebidas com os extratos independente da sua origem (intraespecífico ou interespecífico), mesmo com o efeito atrativo da polpa cítrica, as iscas tratadas foram significativamente menos carregadas do que as iscas do controle, que não tiveram contato com os extratos.

Para os bioensaios com colônias de *A. balzani* o número médio ( $\pm$  erro padrão) de iscas restantes (não carregadas) foi  $2,93 \pm 0,61$  para o controle,  $9,27 \pm 0,36$  para o extrato ExtAc e  $9,6 \pm 0,28$  para o extrato ExtAt. O LME resultou em diferença significativa entre o número de iscas restantes do controle comparado ao número de iscas restantes dos tratamentos, sendo entre Cont *versus* ExtAc ( $p < 0,001$ ) e Cont *versus* ExtAt ( $p < 0,001$ ), porém não houve diferença significativa entre os tratamentos ExtAc *versus* ExtAt ( $p = 0,936$ ) conforme apresentado no gráfico (Figura 3).

A média (média  $\pm$  erro padrão) do tempo de carregamento foi para o controle  $1081 \pm 52$  segundos (cerca de 18 minutos), para o extrato do substrato de *A. balzani*  $1738 \pm 44$  segundos (cerca de 29 minutos) e para o extrato do substrato de *A. opaciceps*  $1758 \pm 39$  segundos (cerca de 29 minutos). Houve diferença significativa entre o tempo de carregamento (sobrevivência) dessas iscas sendo controle *versus* ExtAc  $p = 0,00001$  controle *versus* ExtAt  $p = 0,000004$  e não havendo diferença entre o tempo de carregamento entre os tratamentos com extrato dos substratos ExtAc *versus* ExtAt  $p = 0,52$  (Figura 4).



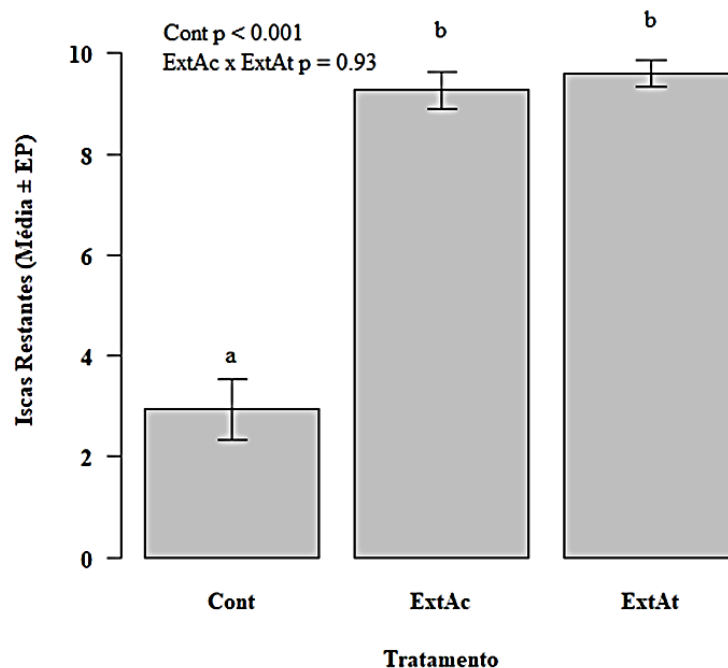


Figura 3. Número de iscas restantes (média  $\pm$  erro padrão) entre o controle (canudos empanados com polpa cítrica embebidos em água/álcool 50%) e os tratamentos (canudos empanados com polpa cítrica embebidos em extrato do substrato de descarte de *A. balzani* - ExtAc ou em extrato do substrato de descarte de *A. opaciceps* - ExtAt quando apresentados às colônias de *A. balzani*. Letras diferentes acima das barras evidenciam diferença significativa entre tratamentos ( $\alpha < 0,05$ ).

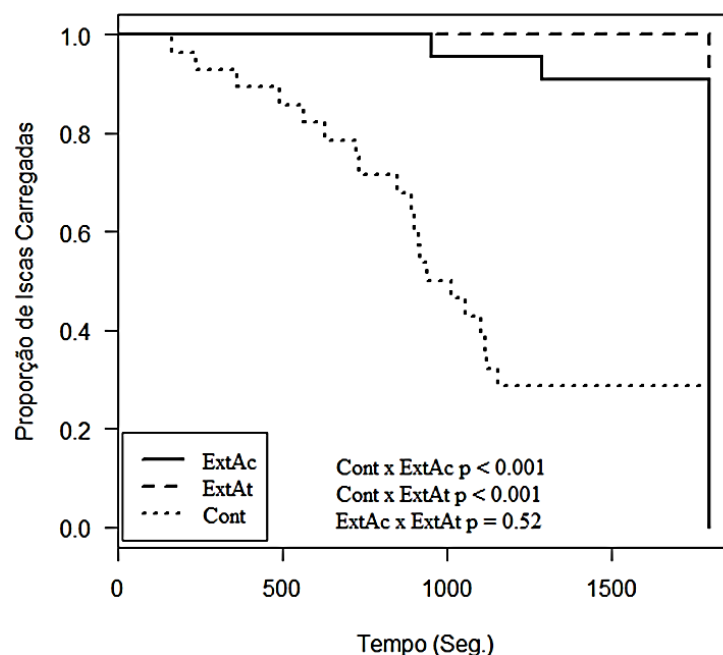


Figura 4. Proporção de iscas carregadas por tempo de carregamento, entre o tratamento controle (canudos empanados com polpa cítrica embebidos em água/álcool 50%) e os tratamentos (canudos empanados com polpa cítrica embebidos em extrato do substrato de descarte de *A.*

*balzani* - ExtAc ou em extrato do substrato de descarte de *A. opaciceps* - ExtAt quando apresentados às colônias de *A. balzani*.

Para os bioensaios com colônias de *A. opaciceps* o número médio ( $\pm$  erro padrão) de iscas restantes (não carregadas) foi  $1,47 \pm 0,36$  para o controle,  $6,44 \pm 0,57$  para o extrato interespecífico (ExtAc) e  $8,19 \pm 0,43$  para o extrato intraespecífico (ExtAt). O LME evidenciou que houve diferença significativa entre o número de iscas restantes do controle comparado ao número de iscas restantes dos tratamentos (Figura 5).

A média ( $\pm$  erro padrão) do tempo de retirada das iscas controle foi de  $640 \pm 52$  segundos (cerca de 10 minutos), para o extrato ExtAc foi de  $931 \pm 42$  segundos (cerca de 15 minutos) e para o extrato ExtAt foi de  $1049 \pm 36$  segundos (cerca de 17 minutos). A análise de sobrevivência nos permite observar que houve diferença significativa entre o tempo de carregamento dessas iscas, sendo o controle *versus* ExtAc  $p = 0,009$ , controle *versus* ExtAt  $p = 0,0004$  e não havendo diferença entre o tempo de carregamento entre os tratamentos com extrato dos substratos ExtAc *versus* ExtAt  $p = 0,16$  (Figura 6).

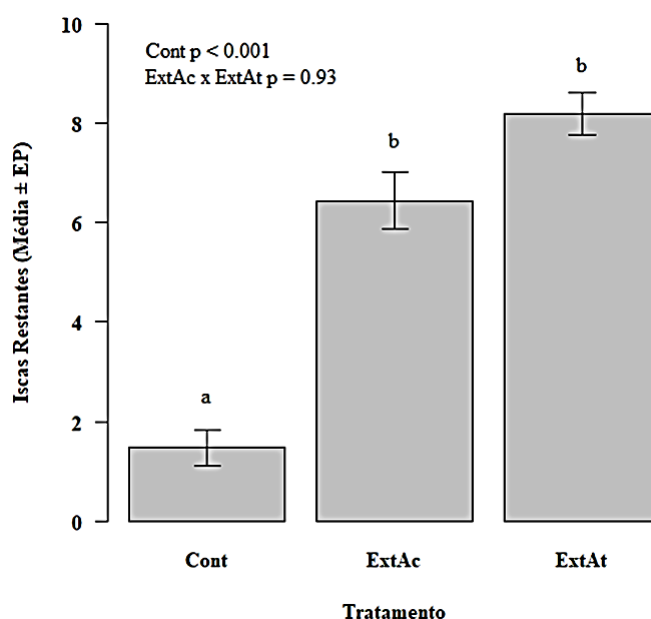


Figura 5. Número de iscas restantes (média  $\pm$  erro padrão) entre o controle (canudos empanados com polpa cítrica embebidos em água/álcool 50%) e os tratamentos (canudos empanados com polpa cítrica embebidos em extrato do substrato de descarte de *A. balzani* (ExtAc) ou em extrato do substrato de descarte de *A. opaciceps* (ExtAt) quando apresentados às colônias de *A. opaciceps*. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre tratamentos ( $\alpha < 0,05$ ).

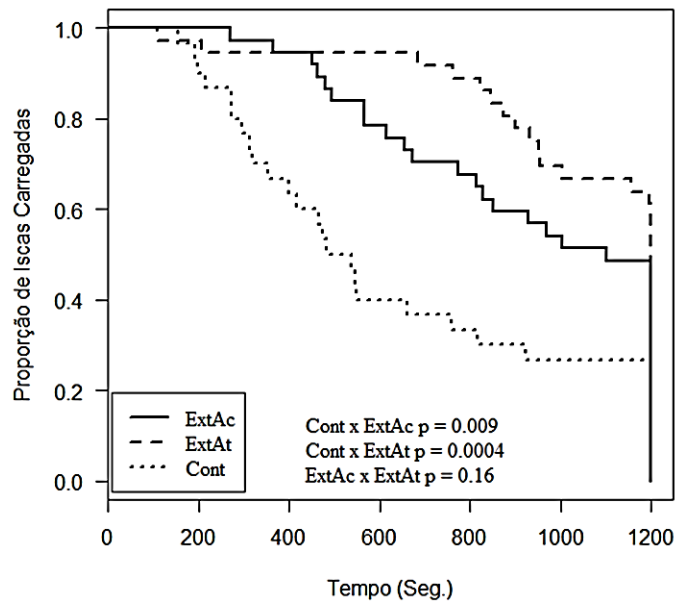


Figura 6. Proporção de iscas carregadas por tempo de carregamento, entre o tratamento controle (canudos empanados com polpa cítrica embebidos em água/álcool 50%) e os tratamentos (canudos empanados com polpa cítrica embebidos em extrato do substrato de *A. balzani* - ExtAc ou em extrato do substrato de *A. opaciceps* - ExtAt quando apresentados às colônias de *A. opaciceps*.

#### 4. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que os extratos hidroalcoólicos preparados com o substrato de descarte produzido por formigas cortadeiras apresentam efeito repelente ao forrageio das formigas cortadeiras assim como o material oferecido “in natura” em estudos anteriores, corroborando a ideia de que o material de descarte pode ser um eficiente método alternativo de manejo (Zeh *et al.*, 1999; Farji-Brener & Sasal, 2003; Ballari & Farji-Brener, 2006).

Os extratos apresentaram repelência significativa pois quase a totalidade das iscas do controle foram coletadas pelas diferentes colônias amostradas e houve pouca coleta de iscas tratadas (menos de 50% nas colônias mais ativas). Além disso, a análise de sobrevivência mostrou que as iscas do controle foram rapidamente carregadas enquanto as iscas tratadas foram “analisadas” cautelosamente pelas operárias e poucas foram carregadas mesmo após o experimento ter chegado ao fim, sendo ainda observado o comportamento de rejeição e abandono das iscas dos tratamentos quando estes eram coletados do ponto de origem. Este comportamento é mais uma evidência de que iscas tratadas apresentam características que foram evitadas pelas operárias, corroborando com nossas hipóteses para o efeito repelente.

A polpa cítrica foi utilizada por ser relatada como forte atrativa e por esse motivo amplamente utilizada em iscas formicidas, para atrair o forrageio sem causar rejeição inicial e fazer com que as formigas disseminem a substância tóxica dentro da colônia (Boaretto & Forti, 1997; Carlos *et al.*, 2009). Mesmo com a forte atratividade da polpa cítrica o efeito repelente apresentado se mostrou efetivo, provocando rejeição das iscas tratadas com o extrato preparado com o substrato de descarte de ambas as espécies. Tal efeito foi tanto intra como interespecífico, ou seja, independente da espécie de origem do substrato, sendo as iscas “manipuladas” diversas vezes pelas formigas operárias antes de serem coletadas e mesmo após essa manipulação várias iscas foram abandonadas, mantendo o comportamento de rejeição inicial.

As formigas selecionam o material a ser cortado a partir das características das plantas, como valor nutricional e suas propriedades físicas e químicas, monitorando a presença de metabólitos tóxicos secundários, além do gasto energético para incorporar esse material (Garcia *et al.*, 2005; Verza *et al.*, 2007). Materiais considerados impróprios para o cultivo do fungo ou que possam ser tóxicos podem ser rejeitados desde o momento do corte até antes da incorporação, sendo as características químicas mais rapidamente detectadas e rejeitadas geralmente no momento do corte (Verza *et al.*, 2007), fato que sugere uma explicação para nossos resultados, visando a higiene e segurança das operárias e da colônia, as iscas tratadas foram “analisadas” e rejeitadas antes da incorporação. Provavelmente, o odor do extrato nas iscas foi associado como um material já descartado na colônia.

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* cultivam a mesma espécie de fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* (Pagnocca *et al.*, 2011), mantém mesmos hábitos de higiene e comunicação, porém as colônias se diferenciam e reconhecem seus indivíduos através do perfil químico da colônia (Viana-Bailez *et al.*, 2011), fato que sugere que as formigas testadas em nosso estudo identificaram o odor das iscas tratadas com os extratos dos substratos de descarte como material exaurido e descartado pela colônia e/ou material demarcado ou descartado por outra colônia, exibindo um perfil químico diferente do seu perfil, o que pode ter sido notado pelo odor e/ou toque da cutícula ao “inspecionar” as iscas, exaltando o territorialismo da colônia ao abandoná-las ou retirá-las da proximidade da trilha de forrageio.

Observando o comportamento das colônias durante o experimento foi possível perceber uma rejeição maior para as iscas tratadas com o ExtAt, apesar de não ter havido significância, isso pode ter acontecido por diferenças de conservação do próprio substrato descartado por *A. opaciceps*, já que o mesmo é depositado internamente, apresenta odor mais marcante e é mais

úmido do que o substrato de descarte de *A. balzani*. O resíduo depositado internamente é relatado como mais propício à proliferação de patógenos (Farji-Brener *et al.*, 2016).

A espécie *A. opaciceps* descarta o substrato em câmaras internas, fato que dificulta a sua coleta, mas não restringe a utilização desse método pois as colônias podem ser mantidas artificialmente em condições de laboratório confinadas em vasilhames plásticos, possibilitando sua manutenção para produção do substrato. Já a espécie *A. balzani* descarta o substrato na superfície do solo, próximo à entrada da colônia, o que facilita sua coleta e utilização. Considerando a ampla distribuição dessas espécies em todo o Estado de Sergipe, bem como a alta densidade de colônias em áreas antropizadas, pode-se considerar que esse método tenha grande viabilidade, uma vez o material de descarte pode ser obtido durante todo o ano e em grande quantidade. Para se ter uma ideia, é possível coletar no campus da UFS (área de estudo do presente trabalho) cerca de 300g (trezentos gramas) de material de descarte de *A. balzani* em apenas uma hora de coleta. Essa quantidade é suficiente para produzir 1L (um litro) de extrato.

Apesar dos resultados obtidos em um experimento de pequena escala como esse, é necessário a continuidade desse estudo em condições de campo, analisando a durabilidade (em dias) do efeito do extrato, a influência de fatores abióticos, sua aplicação em diferentes culturas e para quais pragas será efetivo. Como o efeito intraespecífico se mostrou um pouco mais forte do que o interespecífico para colônias de *Atta*, mesmo não havendo significância, merece mais avaliações quando o extrato for aplicado em culturas.

A continuidade do nosso estudo e a confirmação do efeito em lavouras representam uma nova perspectiva para essa linha de pesquisa, tratando de manejo de formigas cortadeiras, e em contraste com os métodos de manejo citados os extratos não apresentam risco algum ao ambiente e saúde humana. Além desta importante vantagem, em pequena escala este método, se confirmado, poderá ser utilizado sem a necessidade de eliminação das colônias, beneficiando o solo com a melhora da fertilidade e auxiliando o manejo, tanto para programas de reflorestamento como para a agricultura de subsistência, produção de orgânicos ou agroecologia, sendo um método inovador, de baixo custo, de fácil preparo e aplicação, o que reforça a importância e necessidade de continuar testando o efeito dos extratos.

Finalmente, nosso estudo confirma o efeito repelente do substrato com uma nova forma de aplicação e caso haja a confirmação desse efeito em culturas nos abre um cenário novo para métodos de manejo ambientalmente seguros.

## 5. Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Genésio Tâmara Ribeiro, do Laboratório de Entomologia Florestal (LEFLO) e a Dra. Yana Teixeira dos Reis, do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pela ajuda na aquisição do substrato. Ao Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira, do Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pelo auxílio na condução das análises cromatográficas. À Dra. Sinara M. Moreira pelas sugestões para o melhoramento da metodologia. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado. À CAPES (PROAP) e CAPES/FAPITEC/Ed.11/2016 (PROEF) pelo financiamento.

## Referências Bibliográficas

- BALLARI, S. A. & FARJI-BRENER, A. G. Refuse dumps of leaf-cutting ants as a deterrent for ant herbivory: does refuse age matter? **Entomologia Experimentalis et Applicata** 121: 215-219, 2006.
- BARBOSA, F. R.; SILVA, C. S. B. & CARVALHO, G. K. L. Receitas para obtenção de inseticidas naturais de origem vegetal. In: BARBOSA, F. R.; SILVA, C. S. B. & CARVALHO, G. K. L. **Uso de inseticidas alternativos no controle de pragas agrícolas. Documentos, 191** Embrapa Semi-Árido, p. 10-27, 2006.
- BOARETTO, M.A. C. & FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF** Departamento de Defesa Fitossanitária da FCA/UNESP 11(30): 31-46, 1997.
- BOT, A. N. M.; CURRIE C. R.; HART, A. G. & BOOMSMA, J. J. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology Ecology & Evolution** 13: 225-237, 2001.
- CARLOS, A. A.; FORTI, L. C.; CAMARGO, R. S.; MOREIRA, S. M., VERZA, S. S. & DINIZ, E. A. Attractiveness of different citrus pulps to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology** 54(3): 799-805, 2009.
- CERDA, N.V.; TADEY, M.; FARJI-BRENER, A.G. & NAVARRO, M.C. Effects of leaf-cutting ant refuse on native plant performance under two levels of grazing intensity in the Monte Desert of Argentina. **Applied Vegetation Science** 15: 479-487, 2012.
- CRAWLEY, M. J. **The R book**. England: Ed John Wiley & Sons Ltd. 951p, 2007.
- DELABIE, J. H. C.; NASCIMENTO, I. C.; FONSECA, E.; SGRILLO, R. B.; SOARES, P. A. O.; CASIMIRO, A. B. & FURST, M. Biogeografia das formigas cortadeiras (Hymenoptera;

- Formicidae; Myrmicinae; Attini) de importância econômica no leste da Bahia e nas regiões periféricas dos estados vizinhos. **Agrotropica** 9(2): 49-58, 1997.
- DELLA LUCIA, T.M. C.; GANDRA, L. C. & GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science** 70: 14-23, 2013.
- DEL-TORO, I.; RIBBONS, R.R. & PELINI, S.L. The little things that run the world revisited: a review of ant-mediated ecosystem services and disservices (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News** 17: 133-146, 2012.
- DETHIER, L.; BROWNE, B. & CARROLL, N. S. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. **Journal of economic entomology** 53(1): 134-136, 1960.
- FARJI-BRENER, A. G.; ELIZALDE, L.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H. & AMADOR-VARGAS, S. Social life and sanitary risks: evolutionary and current ecological conditions determine waste management in leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 283: 1-7, 2016. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0625>
- FARJI-BRENER, A. G. & ILLES, A. E. Do leaf-cutting ant nests make “bottom-up” gaps in neotropical rain forest: a critical review of the evidence. **Ecology Letters** 3: 219-227, 2000.
- FARJI-BRENER, A. G. & SASAL, Y. Is dump material an effective small-scale deterrent to herbivory by leaf-cutting ants? **Ecoscience** 10: 151-154, 2003.
- FARJI-BRENER, A. G. & WERENKRAUT, V. The effects of ant nests on soil fertility and plant performance: a meta-analysis. **Journal of Animal Ecology** 86(4): 866-877, 2017.
- GARCIA, M. G.; FORTI, L. C.; VERZA, S. S.; NORONHA, N. C. Jr. & NAGAMOTO, N. S. Interference of epicuticular wax from leaves of grasses in selection and preparation of substrate for cultivation of symbiont fungus by *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hym. Formicidae). **Sociobiology** 45(3): 937-947, 2005.
- HAUM, H. B. M. **Substrato produzido pela formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* Emery, 1890 e seu papel na regeneração vegetal**. 2017. 25f. Monografia (Ecologia) – Departamento de Ecologia, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2017.
- HOLLDÖBLER, B., WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press. 732 p, 1990.
- LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SERRÃO, J. E.; CECON, P. R.; SOUZA, L. M. & SOUZA, D. J. Morphometry of the metapleural gland of workers engaged in different behavioral tasks in the ant *Atta sexdens rubropilosa* **Animal Biology** 60(2): 229-236, 2010. DOI 10.1163/157075610x496315

- LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; DeSOUZA, O.; SOUZA, L. M. & SOUZA, D. J. Task performance of midden workers of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) **Journal of Insect Behavior** 26: 873-880, 2013. DOI 10.1007/s10905-013-9403-7
- LARA, F. M. Tipos de resistência. In: LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. Ícone. 2ª ed. p. 35-74, 1991.
- MENDONÇA, A. L.; SILVA, C. E.; MESQUITA, F. L. T.; CAMPOS, R. S.; NASCIMENTO, R. R.; XIMENES, E. C. P. A.; SANT'ANA, A. E. G. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology** 95: 295-303, 2009. DOI 10.1007/s10482-009-9312-0
- MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJI-BRENER, A. & CELLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. **International Journal of Pest Management** 58(3): 225-247, 2012.
- MOREIRA, A. A. & FORTI, L. C. Distribuição de substratos nas colônias de *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Scientia Agricola** 56(2): 465-469, 1999.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. & BACCI JR, M. Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed) **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Editora UFV. 1ª ed. p. 262-283, 2011.
- PIRK, I. G. & FARJI-BRENER, A. G. Can the nutrient-rich soil patches created by leaf-cutting ants favor plant compensation for foliar damage? A test of the compensatory continuum hypothesis. **Plant Ecology** 214: 1059-1070, 2013.
- POLSEN, M.; BOT, A. N. M.; NIELSEN, M. G. & BOOMSMA, J. J. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 52: 151-157, 2002.
- R, DCT R: A language and environment for statistical computing. 2017.
- SANTOS, R. S.; GUERRA, M. B. B.; AMBROGI, B. G. & SOUSA-SOUTO, L. Nest refuse of leaf-cutting ants as a growing substrate for organic farming systems. **Organic Agriculture** 2017: 1-10, 2017.
- SANTOS, R. S.; HAUM, H. B. M. & SOUSA-SOUTO, L. Nest refuse of *Atta opaciceps* (Hymenoptera: Formicidae) increases plant biomass and diversity during the regrowth of herbaceous species. **Applied Soil Ecology** 133: 160-165, 2018.
- SOUSA-SOUTO, L.; GUERRA, M. B. B.; SCHOEREDER, J. H.; SCHAEFER, C. E. G. R., SILVA, W. L. Determinação do fator de conversão em colônias de *Atta sexdens rubropilosa*



- (Hymenoptera: Formicidae) e sua relação com a qualidade do material vegetal cortado. **Revista Árvore**. 31: 163-166, 2007. DOI 10.1590/S0100-67622007000100018
- SOUSA-SOUTO, L.; VIANA-JUNIOR, A. B. & NASCIMENTO, E. S. Spatial distribution of *Acromyrmex balzani* (Emery) (Hymenoptera: Formicidae: Attini) nests using two sampling methods. **Sociobiology**. 60: 162-168, 2013.
- SOUZA, D. J.; SANTOS, J. F. L. & DELLA LUCIA, T. M. C. Organização social das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed) **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Editora UFV. 1ª ed. p. 126-140, 2011.
- URBAS, P.; ARAÚJO, M. V.; LEAL, I. R. & WIRTH, R. Cutting more from cut forests: edge effects on foraging and herbivory of leaf-cutting ants in Brazil. **Biotropica** 39(4): 489-495, 2007.
- VERZA, S. S.; FORTI, L. C.; LOPES, J. F. S.; CAMARGO, R. S. & MATOS, C. A. O. Influence of physical and chemical factors during foraging and culture of the symbiont fungus in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Insect Science** 14: 295-300, 2007. DOI 10.1111/j.1744-7917.2007.00155.x
- VIANA-BAILEZ, A. M.; BAILEZ, O. & MALAQUIAS, K. S. Comunicação química em formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed) **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Editora UFV. 1ª ed. p. 141-164, 2011.
- ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G. T. & LEMES, P. G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in brazilian forest plantations. **Forests** 5: 439-454, 2014.
- ZEH, J.; ZEH, A. & ZEH, D. Dump material as an effective small-scale deterrent to herbivory by *Atta cephalotes*. **Biotropica** 31: 368-371, 1999.

## **CAPÍTULO 2**

### **Efeito repelente do substrato de descarte de formigas cortadeiras contra o pulgão *Lipaphis erysimi* (L) Kaltenbach, 1843**

Hosana Haum Barros Mecenas & Leandro Sousa Souto

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

leandrosouto@ufs.br

## RESUMO

Métodos sustentáveis de manejo de pragas agrícolas são constantemente procurados. O substrato de descarte produzido por formigas cortadeiras é relatado como repelente a seu forrageio. Este substrato é evitado pelas formigas cortadeiras por apresentar matéria orgânica em decomposição, odor desagradável e substâncias nocivas além de possíveis patógenos. Diante disso, analisamos experimentalmente se uma formulação líquida preparada com o substrato de descarte produzido por formigas cortadeiras das espécies *Acromyrmex balzani* e *Atta opaciceps* e borrifada em discos de plantas seria repelente a alimentação do pulgão *Lipaphis erysimi*. Para tanto, realizamos 103 bioensaios em placas de petri de  $\varnothing = 150\text{mm}$ , com um disco de folha de couve manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) borrifado com a solução controle (água/álcool) 50% e um disco de folha borrifado com o extrato do substrato de descarte de *A. balzani* (20%) (n=49) ou do substrato de descarte *A. opaciceps* (20%) (n=54), dispostos um de cada lado e liberados 10 pulgões *Lipaphis erysimi* em cada placa, sendo utilizados no total 1.030 pulgões. Os bioensaios foram comparados através de análise binomial. Houve efeito repelente dos pulgões ao substrato de ambas as espécies. Por ser um estudo pioneiro é necessário haver mais avaliações para preencher as lacunas encontradas, como a identificação das substâncias potencialmente causadoras do efeito, o tempo de duração do mesmo, bem como outras culturas a serem protegidas e outras pragas a serem repelidas.

Palavras-chave: *Acromyrmex balzani*, *Atta opaciceps*, controle, extrato bioativo, herbivoria, manejo.

## ABSTRACT

Sustainable management methods for agricultural pests are constantly being sought. The nest refuse produced by leaf cutting ants is reported as repellent to their foraging. This substrate is avoided by the ants because it represents a harmful substrate. Therefore, we analyzed experimentally if a liquid formulation prepared with the nest refuse produced by leaf cutting ants of the species *Acromyrmex balzani* and *Atta opaciceps* and sprayed on plant discs would repel the feeding of the aphid *Lipaphis erysimi*. To do this, we performed 103 bioassays in  $\varnothing = 150\text{mm}$  petri dishes, with a disc of leaf of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. Acephala) sprinkled with 50% control solution (water / alcohol) and another sprinkled leaf disc with the extract of *A. balzani* refuse (20%) ( $n = 49$ ) or the extract of *A. opaciceps* refuse (20%) ( $n = 54$ ). The leaf discs were disposed on each side with 10 aphids *Lipaphis erysimi* in each plate. In total 1,030 aphids were tested. The bioassays were compared through binomial analysis. There was a repellent effect of the aphids on the substrate of both species. Because it is a pioneering study, it is necessary to have more evaluations to fill the gaps found, such as the identification of substances that are potentially causing the effect, the duration of the effect, as well as to test the repellent effect in other crops and against other pest species.

Key words: *Acromyrmex balzani*, *Atta opaciceps*, control, bioactive extract, herbivory, handling.

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento na pressão por maior produção agrícola e consequente expansão deste setor fazem dos inseticidas o método de controle mais utilizado, visto que há uma grande variedade de produtos disponíveis e sua utilização é simples, não requerendo grandes conhecimentos. Entretanto, apresentam alto custo e efeitos adversos para o meio ambiente e saúde humana, o que leva a uma busca constante por métodos de manejo sustentáveis (Bettiol & Ghini, 2001; Campanhola & Bettiol, 2003).

Os métodos de manejo mais sustentáveis, apesar de pouco explorados, incluem técnicas como o uso de cultivares resistentes, do manejo integrado de pragas como controle biológico, de inseticidas e repelentes preparados com compostos orgânicos (Bettiol & Ghini, 2001; Campanhola & Bettiol, 2003). O efeito repelente é o efeito provocado por substâncias químicas, geralmente liberadas pelas plantas, onde o herbívoro se locomove em direção oposta à fonte da substância. Já o efeito deterrente, também provocado por metabólitos das plantas, é o efeito de inibir a manutenção da alimentação ou oviposição, quando na ausência do deterrente o herbívoro mantê-las-ia normalmente (Dethier *et al.*, 1960; Lara, 1991). Neste sentido, o efeito repelente é apresentado como uma forma sustentável de proteger plantas contra o ataque de herbívoros.

Estudos recentes apontam que o substrato de descarte produzido por formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) apresenta efeito repelente ao seu forrageio (Zeh *et al.*, 1999; Farji-Brener & Sasal, 2003; Ballari & Farji-Brener, 2006).

O substrato de descarte é um aglomerado composto de partículas restantes do material vegetal transportado pelas formigas para o interior do ninho, acrescido de restos de formigas mortas e do fungo simbiote não consumido e degradado. Por se tratar de matéria orgânica em decomposição ou apresentar contaminantes, como fungos competidores, além de substâncias bactericidas e fungicidas produzidas pelas formigas ou pelo processo de degradação, pode se tornar tóxico e por isso é constantemente retirado dos locais onde estão o fungo sadio, a rainha, os ovos e as larvas. Dependendo da espécie de formiga, o substrato de descarte é depositado em câmaras internas da colônia escavadas para essa finalidade ou externamente em área próxima às colônias (Cerdeira *et al.*, 2012) (e. g. *Acromyrmex balzani* Emery, 1890 apresenta câmaras externas e *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 apresenta câmaras internas).

Estudos relatam que há um aumento na mortalidade de operárias em contato com as câmaras de descarte (Bot *et al.*, 2001; Lacerda *et al.*, 2013) e com isso o contato seria evitado

pelas operárias forrageiras (Zeh *et al.*, 1999; Ballari & Farji-Brener, 2006). Desta forma, provavelmente as formigas podem associar o odor ou alguma outra característica física ou química do substrato de descarte à presença de patógenos, evitando assim seu contato. Paralelamente, diversas substâncias produzidas por glândulas específicas nas formigas atuam na função antifúngica ou bactericida, a exemplo das glândulas mandibular e metapleurar, que estão diretamente relacionadas à higiene das operárias e da colônia (Polisen *et al.*, 2002; Mendonça *et al.*, 2009). Essas substâncias podem permanecer ativas no material de descarte e atuar em favor do combate a organismos contaminantes do fungo simbionte da colônia e até mesmo das operárias. Assim, tais substâncias podem também atuar indiretamente na repelência de insetos associados às colônias de formigas cortadeiras.

Uma vez que as formigas evitam o contato do material de descarte em áreas “limpas” da colônia, esse material poderia ser uma alternativa de manejo de formigas cortadeiras em pequena escala em áreas agrícolas. Explorando esses aspectos e os estudos realizados (Zeh *et al.*, 1999; Farji-Brener & Sasal, 2003; Ballari & Farji-Brener, 2006) testamos o efeito repelente do substrato de descarte produzido por formigas cortadeiras utilizando uma formulação líquida preparada com o substrato de descarte e obtivemos resultado significativo na proteção de iscas, sendo que nesse caso, a aplicação da formulação pode ser direta na planta, por meio foliar, influenciando também a diminuição da herbivoria por outros insetos, em virtude da presença do material diretamente nas folhas (ver capítulo 1).

Diante disso, o presente estudo verificou o efeito repelente do substrato de descarte produzido por formigas cortadeiras das espécies *Acromyrmex balzani* e *Atta opaciceps*, em formulação líquida (extrato hidroalcoólico), testando este efeito a outro herbívoro, o pulgão *Lipaphis erysimi* (L) Kaltenbach, 1843 (sugador de seiva). Para tanto, o estudo partiu das seguintes hipóteses *i*) uma vez que o substrato de descarte é tóxico e evitado pelas formigas cortadeiras, plantas/folhas em contato com este substrato poderão ser evitadas pelo sugador de seiva; *ii*) uma vez que plantas/folhas tratadas com substrato sejam evitadas pelo sugador de seiva, poderão também ser evitadas quando tratadas com o extrato de ambas as espécies de cortadeiras, independente da origem do substrato de descarte. Para tanto, as premissas das hipóteses foram testadas *i*) os pulgões *Lipaphis erysimi* evitarão se alimentar de plantas tratadas com o extrato do substrato de descarte produzido por formigas cortadeiras; *ii*) o efeito repelente será observado independente da origem do substrato (*A. balzani* ou *A. opaciceps*).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Local de estudo e espécies utilizadas

O estudo foi realizado no campus da Universidade Federal de Sergipe em São Cristóvão (10°55'33.55"S 37°6'8.327"W).

O pulgão *Lipaphis erysimi* (L.) Kaltenbach, 1843 (Hemiptera: Aphididae) é praga comum das Brassicaceae, como a couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.) e em épocas de surto pode causar danos de até 70% a essas culturas (Atri *et al.*, 2012), sejam danos diretos, consumindo a seiva, reduzindo o tecido foliar e consequentemente a fotossíntese ou indiretos, como a transmissão de vírus fitopatogênicos (Salvadori *et al.*, 2005).

A espécie *Acromyrmex balzani* Emery, 1890 foi escolhida por possuir ampla distribuição em ambientes perturbados, além de uma alta densidade de colônias nesses ambientes, chegando a 900 colônias/ha na área de estudo (Sousa-Souto *et al.*, 2013) e ter como característica peculiar o descarte do resíduo orgânico externamente ao ninho, na superfície do solo, facilitando a coleta e disposição no ambiente (Farji-Brener & Illes, 2000).

A espécie *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939 foi escolhida por ser facilmente encontrada em áreas abertas do sertão, beiras de estrada e áreas urbanizadas de todo o Nordeste brasileiro, comum em Sergipe, formam ninhos tipo murundus de até 2,5m de altura com numerosas entradas distribuídas radialmente com o amadurecimento da colônia (Delabie *et al.*, 1997).

As espécies foram escolhidas a fim de minimizar custo e tempo de execução do estudo, sendo espécies de fácil coleta dentro das dependências da Universidade Federal de Sergipe ou podendo ser mantidas com a estrutura local.

### 2.1 Coleta dos substratos

O substrato de descarte produzido por *A. balzani* foi coletado em campo, dentro das dependências da Universidade Federal de Sergipe, nos montículos descartados pelas próprias colônias da espécie, caracterizado como um resíduo de coloração clara em frente à entrada do ninho, sendo recolhido com auxílio de uma colher, depositado em sacos de papel, levado ao Laboratório de Ecologia de Insetos e posto em bandeja de aço inoxidável em estufa a 60°C por 48h para eliminar possíveis patógenos ou contaminantes que possam estar presentes na vegetação utilizada como substrato de forrageio.

O substrato de descarte produzido por *A. opaciceps* foi coletado de 10 colônias mantidas no Laboratório de Entomologia Florestal do Departamento de Engenharia Florestal e por uma colônia mantida em laboratório no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe. Este substrato é descartado em câmaras dispostas para essa finalidade e apresenta coloração marrom escuro, sendo coletado com auxílio de uma colher, depositado em vasilhame plástico, levado ao Laboratório de Ecologia de Insetos do Departamento de Ecologia da mesma instituição e posteriormente levado em bandeja de aço inoxidável à estufa a 60°C por 48h para eliminar possíveis patógenos ou contaminantes que possam estar presentes na vegetação utilizada como substrato de forrageio.

## **2.2 Preparo dos extratos**

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados com concentração de 20% p/v, sendo adicionado 100mL de álcool etílico 100% e 100mL de água destilada a 40g de substrato separadamente para cada espécie, misturado no momento do preparo e duas vezes ao dia, deixado em repouso a temperatura ambiente, finalizando com 48h quando então foram filtrados e armazenados a temperatura ambiente, seguindo metodologia modificada para calda de fumo a partir de Barbosa *et al.*, 2006.

## **2.3 Bioensaio de escolha**

Plantas de couve foram cultivadas a partir da sementeira de genótipos comerciais de *Brassica oleracea* (L) var. *acephala* D.C. (couve-manteiga da Geórgia da empresa Isla Park ®), em bandejas de isopor com 200 células. Foi utilizado o substrato comercial Vitaplan® composto de: casca de *Pinus* sp., areia para substrato, vermicomposto e vermiculita. Foi depositada uma semente por célula a 0,5cm de profundidade do substrato. Após a sementeira, a bandeja foi mantida em viveiro telado localizado na área externa do bloco A do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe.

Após trinta dias de sementeira, as mudas foram transplantadas para vasos de jardinagem (3,6L), utilizando duas mudas por vaso e mantidas no mesmo local para manutenção da colônia de pulgões.

Os pulgões *Lipaphis erysimi* foram coletados de plantas de couve cultivadas em casa de vegetação no Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Sergipe. Uma folha



infestada com os pulgões foi retirada e transferida para as plantas de couve cultivadas para a manutenção dos mesmos e dispostas em gaiolas de plástico teladas (45x45x45cm, malha de 149µm, Lab Creation, Piracicaba, SP) para evitar sua fuga, sendo colocadas três ou quatro plantas por gaiola. As plantas de couve mortas foram substituídas por plantas novas garantindo alimentação constante para os pulgões. Os pulgões foram deixados em jejum mínimo de 1h anterior aos testes.

Com auxílio de vazador metálico manual foram feitos discos de folhas da couve *Brassica oleracea* var. *acephala* com 1,8cm de diâmetro. Os discos receberam em suas faces abaxial e adaxial uma camada do extrato a ser testado com auxílio de borrifador manual e algodão (0,05mL de extrato por disco), deixados secar em temperatura ambiente. Extratos das duas espécies foram testados separadamente contra o controle.

Para o bioensaio foi utilizada a metodologia adaptada a partir de Roobakkumar *et al.* (2010), onde em placas de petri 150mm foram dispostos um disco de cada lado, tratamento e controle, sorteados ao acaso, liberados 10 pulgões no centro da placa, portanto cada placa de petri (uma arena) foi considerada um bioensaio (Figura 1). Após 1h para aclimação e escolha, os pulgões foram contabilizados de acordo com a escolha entre os discos tratamento ou controle, observando o comportamento por 1 minuto e considerando escolha se o pulgão se mantivesse parado em alimentação, sendo observado se havia tentativa de alimentação, “inspeção” do disco ou comportamento de abandono pós tentativa de alimentação. Foram realizados 49 bioensaios com o total de 490 pulgões com extrato do substrato de *A. balzani* e 54 bioensaios com o total de 540 pulgões com extrato do substrato de *A. opaciceps*.

Os resultados foram analisados utilizando o teste Binomial, já que os dados mostram resultados de escolha, onde não há valores a mensurar, mas sim a probabilidade de sucesso ou insucesso na questão proposta (Crawley, 2007). Os dados foram analisados com auxílio do software R (R Core Team, 2017).

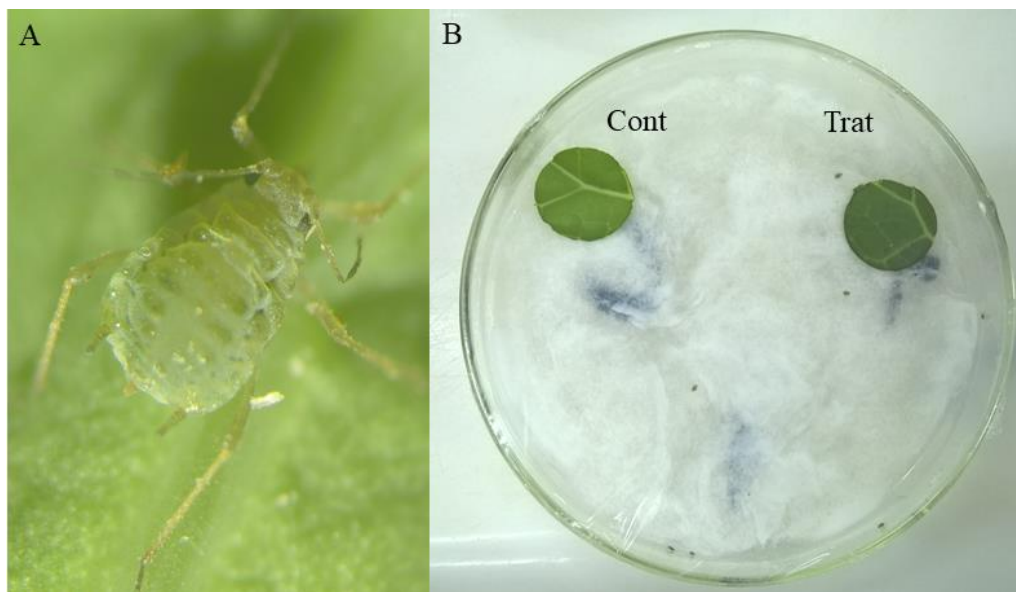


Figura 1. Desenho experimental do bioensaio: pulgão *Lipaphis erysimi* em folha de couve manteiga (A). Bioensaio de atratividade em placa de petri com dois discos de couve manteiga e pulgões liberados para escolha entre os tratamentos (B).

#### 2.4 Análise dos extratos através de cromatografia líquida (HPLC-DAD)

Os extratos preparados com os substratos de descarte foram submetidos a análise por cromatografia líquida visando a obtenção do perfil cromatográfico e tentativa de identificação dos principais compostos presentes em cada extrato.

As amostras foram preparadas a partir de aproximadamente 15mg dos extratos de *A. balzani* e *A. opaciceps* e, em seguida, solubilizadas em 1mL de metanol grau HPLC. As soluções resultantes foram submetidas a tratamento por extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos C-18 (Phenomenex) antes das análises cromatográficas. As amostras foram analisadas em sistema de cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) da marca Shimadzu (Quioto, Japão), modelo Prominence® composto por: módulo de comunicação CBM-20A, de gaseificador DGU-20A3, sistema binário de bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector espectrofotométrico com arranjo de diodos SPD-M20A, forno de colunas CTO-20A. Para a análise foi empregado o modo gradiente de eluição, tendo como fase móvel uma solução 0,1% ácido fórmico em água (A) e metanol (B), variando de 5% a 100% (B) durante 80 minutos, permanecendo em 100% (B) por 20 minutos e retornando para 5% (B) em 1 minuto; coluna de fase estacionária fenil-hexil 150mm x 4,6mm (Phenomenex, Kinetex®, 5µm) e fluxo de 1mL/min, com temperatura do forno à 40°C.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Bioensaio de escolha

Os bioensaios realizados com extrato do substrato produzido por *A. balzani* (ExtAc) apresentaram 35 respostas (350 pulgões) do total de 49 testes (490 pulgões) para o controle (72%), já os bioensaios com extrato do substrato de *A. opaciceps* apresentaram 40 respostas (400 pulgões) do total de 54 bioensaios realizados para o controle (74%). Assim, ambos os extratos apresentaram diferença significativa em relação ao controle, evidenciando o efeito repelente para as duas espécies (ExtAc  $p = 0,003$  e ExtAt  $p = 0,0005$ ) com os pulgões mantendo a preferência para o controle (Figura 2).

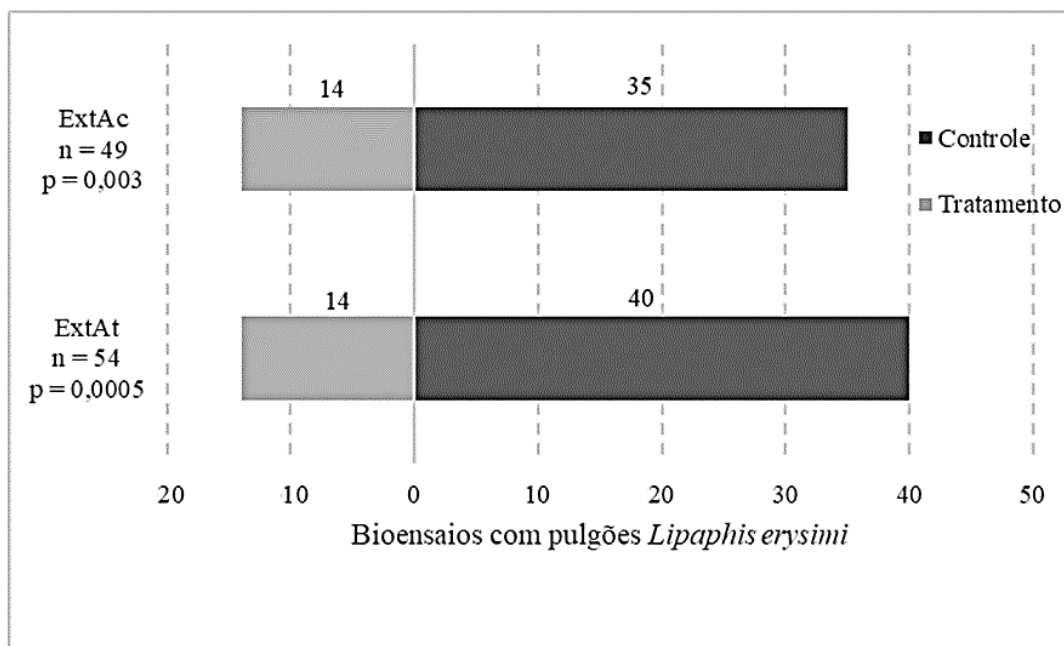


Figura 2. Bioensaios com pulgões *Lipaphis erysimi* em placa de petri 150mm com dois discos de folhas de *Brassica oleracea* (L) var. acephala D.C., mostrando preferência para o disco embebido pelo controle (água/álcool 50%) quando comparado a disco embebido pelo tratamento com extrato hidroalcoólico (50%) 20% p/v de substrato de descarte produzido por formigas cortadeiras ExtAc - *Acromyrmex balzani* ou ExtAt - *Atta opaciceps*. Números acima das barras mostram resultados das respostas de cada (controle ou tratamento).

### 3.2 Análise dos extratos através de cromatografia líquida (HPLC-DAD)

O perfil cromatográfico dos extratos de *A. balzani* e *A. opaciceps* estão mostrados nas figuras 3 e 4, respectivamente.

As análises cromatográficas nas condições utilizadas não apresentaram espectros de UV elucidativos que possam indicar com confiabilidade as substâncias presentes em cada extrato. Os espectros UV sugerem que as substâncias presentes podem ser possivelmente metabólitos secundários oriundos das plantas forrageadas pelas colônias das quais coletamos o substrato de descarte.

Os espectros de UV do extrato do substrato de descarte de *A. balzani* (Figura 3B) são compatíveis com espectros de flavonoides, tais como de ácido fenólico como o ácido p-cumárico ou de um ácido fenólico simples (Figura 3).

O perfil cromatográfico do extrato do substrato de descarte de *A. opaciceps* (Figura 4) se mostrou muito distinto daquele de *A. balzani*. O espectro UV do pico principal (Figura 4B) foi compatível com o do ácido gálico – outro ácido fenólico simples.

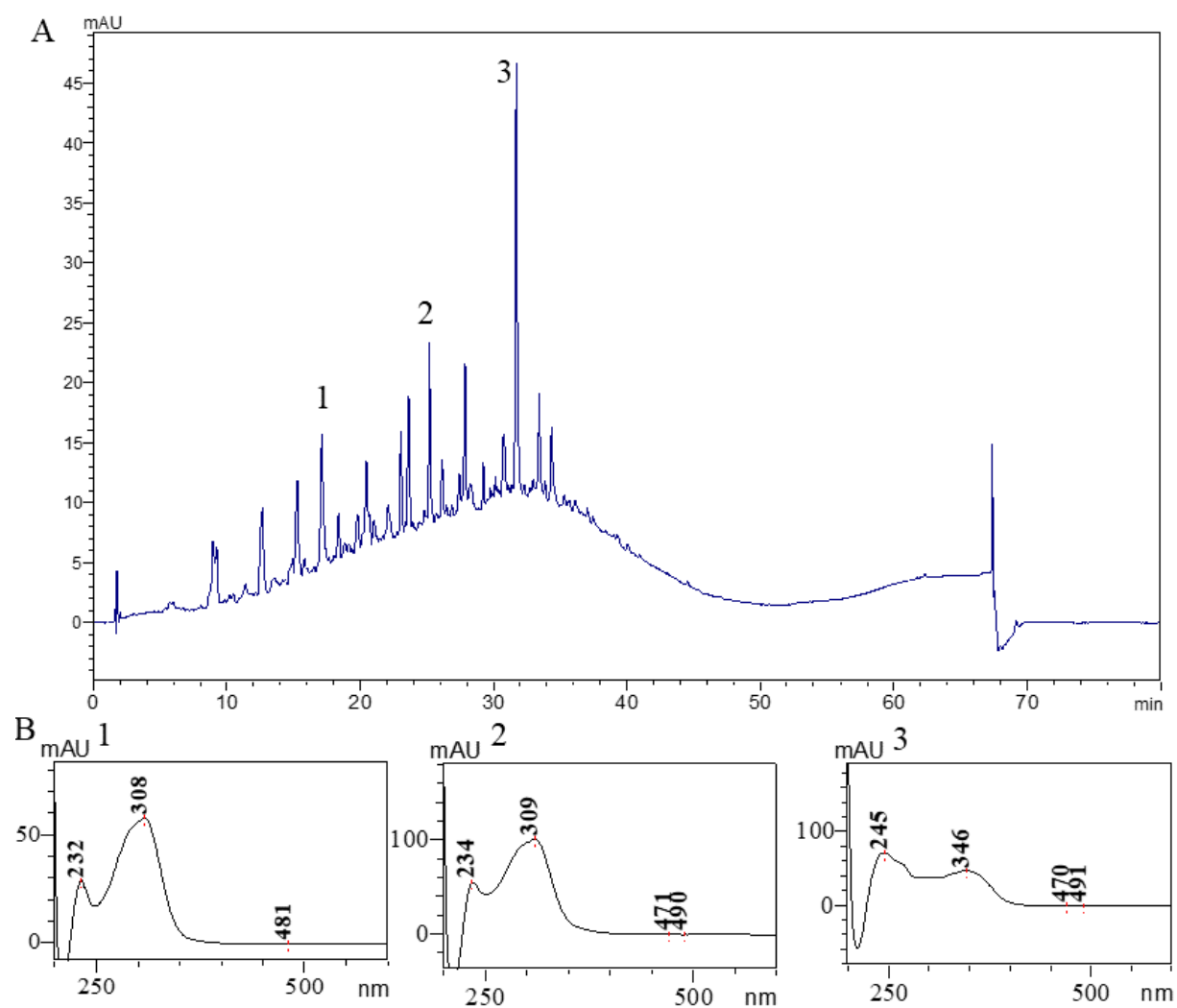


Figura 3. Perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD do extrato hidroalcoólico (50%) 20% p/v de substrato de descarte de *Acromyrmex balzani* a  $\lambda = 344\text{nm}$  (A). Espectros UV dos picos 1, 2 e 3 (B).

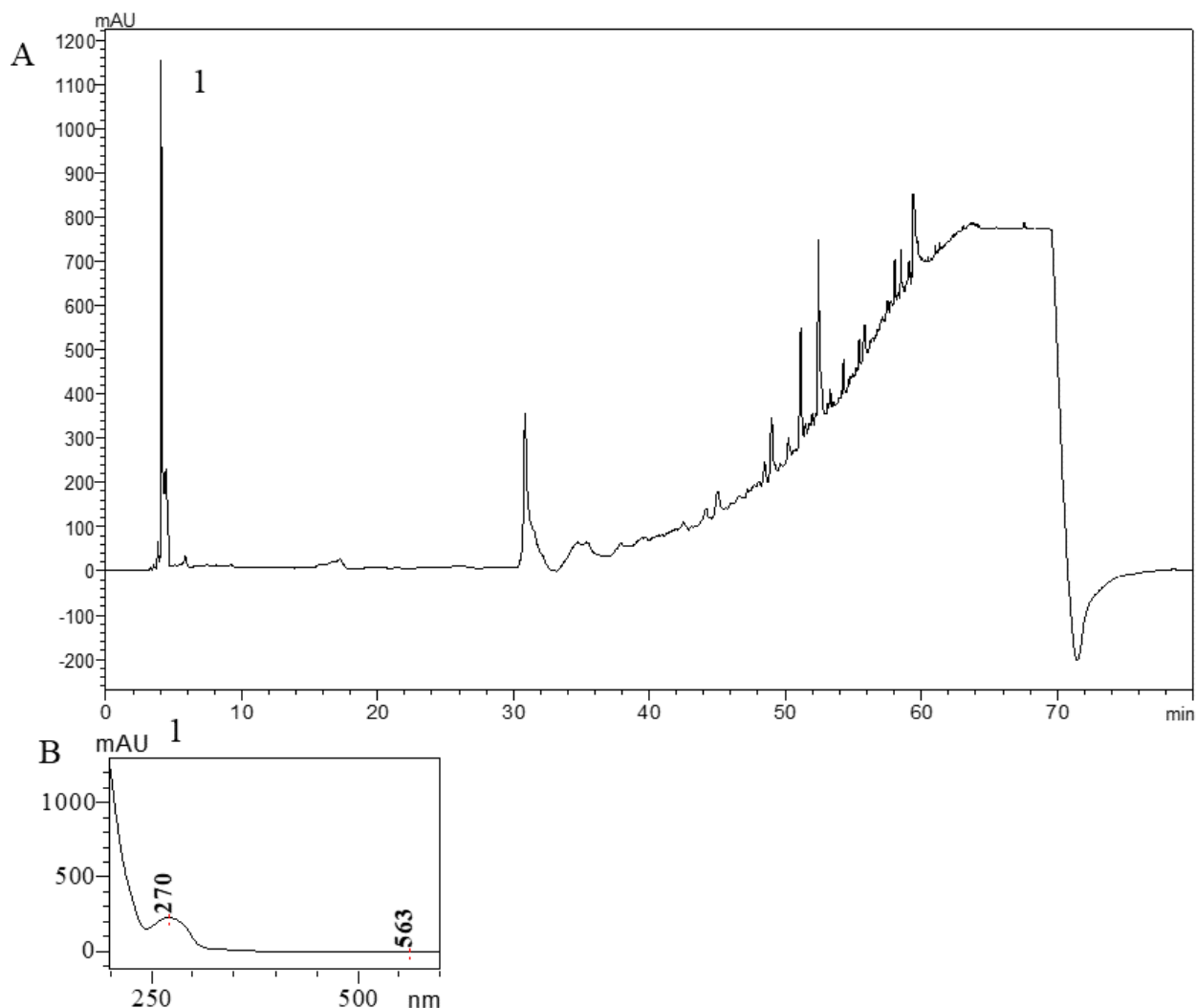


Figura 4. Perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD do extrato hidroalcoólico (50%) 20% p/v de substrato produzido por *Atta opaciceps* a  $\lambda = 344\text{nm}$  (A). Espectro UV do pico 1 (B).

#### 4. DISCUSSÃO

O extrato hidroalcoólico de ambas as espécies de formigas cortadeiras foram eficientes na repelência do pulgão *Lipaphis erysimi* evidenciando seu uso potencial como método alternativo para manejo desta praga em condições de cultivo orgânico de couve. Estudos anteriores já haviam verificado a eficiência de extratos líquidos aplicados nas folhas, como o extrato de fumo ou de nim (Singh *et al.*, 1988; Lovatto *et al.*, 2004), porém este é o primeiro estudo que aborda a utilização de material de descarte de formigas cortadeiras como adjuvante no manejo de uma praga agrícola, apesar de terem sido feitos apenas testes em laboratório com discos de folhas.

A resposta de *L. erysimi* aos extratos de ambas as espécies foi similar, corroborando com a ideia de que o substrato de descarte de ambas as espécies poderá ser utilizado como bioativo no manejo de pragas.

Os pulgões se locomoveram aleatoriamente na arena e diversas vezes andavam sobre os discos de folhas para iniciarem sua alimentação, sendo observado troca na escolha do disco, abandonando o disco tratado e buscando o disco controle (sem contato com o extrato) para a alimentação. Apesar de não ter havido elucidação na análise química, os espectros sugerem algumas classes de compostos mais abrangentes. Esses compostos são oriundos essencialmente de tecidos vegetais e atuam como agentes de defesa química de plantas, fato que seria possível explicar o comportamento observado nos pulgões, havendo estudos que mostram uma variedade de insetos sensíveis aos flavonoides ou que tiveram alimentação inibida pela sua presença (Chen *et al.*, 2004; Sosa *et al.*, 2004; Treutter, 2006) bem como, estudos relatam a atividade inibidora do trato digestivo de insetos associada ao consumo de tecidos vegetais com ácido gálico, causando mau funcionamento do trato intestinal, prejudicando a digestão (Bernays, 1981; Salminen & Lempa, 2002; Wiggins *et al.*, 2003), sendo entretanto, necessário mais análises para encontrarmos os potenciais causadores do efeito testado, como abordagens cromatográficas diferentes, preparo de amostras com outros solventes ou até outros tipos de análises químicas.

Além dos compostos oriundos dos tecidos vegetais, é sabido que o substrato de descarte possui resíduos de secreção das glândulas metapleurais e mandibular das formigas cortadeiras, tais secreções possuem ação antifúngica e bactericida (Polson *et al.*, 2002; Mendonça *et al.*, 2009) podendo atuar como um composto de odor estranho aos pulgões. A glândula de Dufour também atua liberando feromônio de alarme em formigas cortadeiras (Cammaerts *et al.*, 1981; Attygalle *et al.*, 1983). É provável que traços das substâncias dessas glândulas ainda estejam presentes no substrato de descarte, podendo atuar estimulando algum comportamento repulsivo nos pulgões.

O pulgão é um herbívoro sugador de seiva, o que o torna sensível a alterações foliares físicas (como a dureza) e químicas (como a presença de metabólitos), enfatizando o potencial do efeito repelente do substrato de descarte, mostrando que o efeito não atuou apenas na lâmina foliar mas pode ser absorvido pela planta e agir nos tecidos internos, causando uma barreira desagradável ao contato do aparelho bucal, além de algum efeito negativo olfativo ou gustativo ao pulgão. O efeito pode então ser diferente para outras guildas herbívoras, como mastigadores

e minadores, reforçando a necessidade de novos estudos para verificar o potencial também para essas guildas.

Nossos resultados apresentam evidências de que os extratos de substrato de descarte de formigas cortadeiras podem ser usados como repelentes em situações de campo no manejo de pulgões e abrem possibilidades de estudos futuros. Entre estas possibilidades pode-se citar o aprofundamento da aplicação deste método em condições de campo, a definição do tempo de duração do efeito repelente, em quais culturas e pragas o extrato é efetivo, quais substâncias químicas estão presentes e causam o efeito repelente observado.

De todas as possibilidades ainda em aberto, um ponto chave para a viabilidade desta técnica é a elucidação do tempo de duração (em dias) do efeito repelente e se há influência de variáveis abióticas (como pluviosidade) nesse tempo de duração. Ao longo do experimento foram detectadas diversas dificuldades de manutenção das colônias de pulgão em condições ideais de teste, fato que inviabilizou os experimentos com foco no tempo de duração do efeito repelente. Contudo, é notório até o presente momento, que os substratos de descarte das espécies *Acromyrmex balzani* e *Atta opaciceps* apresentam potencial efeito repelente e trazem uma nova perspectiva na busca por métodos de manejo sustentáveis.

## **5. Agradecimentos**

Agradecemos ao Dr. Genésio Tâmara Ribeiro, do Laboratório de Entomologia Florestal (LEFLO) e a Dra. Yana Teixeira dos Reis, do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pela ajuda na aquisição do substrato. Ao Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira, do Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pelo auxílio na condução das análises cromatográficas. Ao André Luiz Souza da Silva pelo auxílio na manutenção da cultura de couve manteiga. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado. À CAPES (PROAP) e CAPES/FAPITEC/Ed.11/2016 (PROEF) pelo financiamento.

## **Referências Bibliográficas**

ATTYGALLE, A. B.; EVERSLED, R. P.; MORGAN, E. D. & CAMMAERTS, M. C. Dufour gland secretions of workers of the ants *Myrmica sulcinodis* and *Myrmica lobicornis*, and



- comparison with six other species of *Myrmica*. **Insect Biochemistry** 13(5): 507-512, 1983. DOI: 10.1016/0020-1790(83)90009-4
- ATRI, C.; KUMAR, B.; KUMAR, H.; KUMAR, S.; SHARMA, S. & BANGA, S. S. Development and characterization of *Brassica juncea* – *fruticulosa* introgression lines exhibiting resistance to mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt). **BioMed Central Genetics** 13:104, 2012.
- BALLARI, S. A. & FARJI-BRENER, A. G. Refuse dumps of leaf-cutting ants as a deterrent for ant herbivory: does refuse age matter? **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 121: 215-219, 2006.
- BARBOSA, F. R.; SILVA, C. S. B. & CARVALHO, G. K. L. Receitas para obtenção de inseticidas naturais de origem vegetal. In: BARBOSA, F. R.; SILVA, C. S. B. & CARVALHO, G. K. L. **Uso de inseticidas alternativos no controle de pragas agrícolas. Documentos, 191**. Embrapa Semi-Árido, p. 10-27, 2006.
- BERNAYS, E. A. Plant tannins and insect herbivores: an appraisal. **Ecological Entomology** 6: 353-360, 1981.
- BETTIOL, W. & GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: MICHEREFF, S. J. & BARROS, R. (Eds). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. 1ª ed. UFRPE, Imprensa Universitária, p. 1-13, 2001.
- BOT, A. N. M.; CURRIE C. R.; HART, A. G. & BOOMSMA, J. J. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology Ecology & Evolution** 13: 225-237, 2001.
- CAMMAERTS, M. C.; EVERSLED, R. P. & MORGAN, E. D. Comparative study of the dufour gland secretions of workers of four species of *Myrmica* ants. **Journal of Insect Physiology** 27(1): 59-65, 1981. DOI 10.1016/0022-1910(81)90033-0
- CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (Eds). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. 1ª ed. Embrapa Meio Ambiente, p. 13-50, 2003.
- CERDA, N.V.; TADEY, M.; FARJI-BRENER, A.G. & NAVARRO, M.C. Effects of leaf-cutting ant refuse on native plant performance under two levels of grazing intensity in the Monte Desert of Argentina. **Applied Vegetation Science** 15: 479-487, 2012.
- CHEN, K.; OHMURA, W.; DOI, S. & AYOAMA, M. Termite feeding deterrent from Japanese larch wood. **Bioresource Technology** 95: 129-134, 2004.
- CRAWLEY, M. J. **The R book**. England: Ed John Wiley & Sons Ltd. 951p, 2007.

- DELABIE, J. H. C.; NASCIMENTO, I. C.; FONSECA, E.; SGRILLO, R. B.; SOARES, P. A. O.; CASIMIRO, A. B. & FURST, M. Biogeografia das formigas cortadeiras (Hymenoptera; Formicidae; Myrmicinae; Attini) de importância econômica no leste da Bahia e nas regiões periféricas dos estados vizinhos. **Agrotropica** 9(2): 49-58, 1997.
- DETHIER, L.; BROWNE, B. & CARROLL, N. S. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. **Journal of economic entomology** 53(1): 134-136, 1960.
- FARJI-BRENER, A. G. & ILLES, A. E. Do leaf-cutting ant nests make “bottom-up” gaps in neotropical rain forest: a critical review of the evidence. **Ecology Letters** 3: 219-227, 2000.
- FARJI-BRENER, A. G. & SASAL, Y. Is dump material an effective small-scale deterrent to herbivory by leaf-cutting ants? **Ecoscience** 10: 151-154, 2003.
- LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; DeSOUZA, O.; SOUZA, L. M. De & SOUZA, D. J. De Task performance of midden workers of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) **Journal of Insect Behavior** 26: 873-880, 2013. DOI 10.1007/s10905-013-9403-7
- LARA, F. M. Tipos de resistência. In: LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. Ícone. 2ª ed. p. 35-74, 1991.
- LOVATTO, P. B.; GOETZE, M. & THOMÉ, G. C. H. Efeito de extratos de plantas silvestres da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Ciência Rural**. 34(4): 971-978, 2004.
- MENDONÇA, A. L.; SILVA, C. E.; MESQUITA, F. L. T.; CAMPOS, R. S.; NASCIMENTO, R. R.; XIMENES, E. C. P. A. & SANT'ANA, A. E. G. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology** 95: 295-303, 2009. DOI 10.1007/s10482-009-9312-0
- POLSEN, M.; BOT, A. N. M.; NIELSEN, M. G. & BOOMSMA, J. J. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 52: 151-157, 2002.
- R, DCT R: A language and environment for statistical computing. 2017.
- ROOBAKKUMAR, A.; SUBRAMANIAM, M. S. R.; BADU, A. & MURALEEDHARAN, N. Bioefficacy of certain plant extracts against the red spider mite, *Oligonychus coffeae* (Nietner) (Acarina: Tetranychidae) infesting tea in Tamil Nadu, India. **International Journal of Acarology**, 36(3): 255-258, 2010.

- SALMINEN, J. -P. & LEMPA, K. Effects of hydrolysable tannins on a herbivorous insect: fate of individual tannins in insect digestive tract. **Chemoecology** 12: 203-211, 2002.
- SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R. V. S. & SILVA, M. T. B. Manejo de pulgões. **Revista Cultivar** 75: 32-34, 2005.
- SINGH, R. P., DEVAKUMAR, C. & DHINGRA, S. Activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernel extracts against the mustard aphid *Lipaphis erysimi*. **Phytoparasitica**. 16(3): 225-230, 1988.
- SOSA, T.; CHAVES, N.; ALIAS, J. C.; ESCUDERO, J. C.; HENAO, F. & GUTIÉRREZ-MERINO, C. Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Cistus ladanifer* L.: a plant defense mechanism against herbivores. **Journal of Chemical Ecology** 30(6): 1087-1101, 2004.
- SOUSA-SOUTO, L.; VIANA-JUNIOR, A. B. & NASCIMENTO, E. S. Spatial distribution of *Acromyrmex balzani* (Emery) (Hymenoptera: Formicidae: Attini) nests using two sampling methods. **Sociobiology**. 60: 162-168, 2013.
- TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters** 4: 147-157, 2006. DOI 10.1007/s10311-006-0068-8
- WIGGINS, N. L.; McARTHUR, C.; McLEAN, S. & BOYLE, R. Effects of two plant secondary metabolites, cineole and gallic acid, on nightly feeding patterns of the common brushtail possum. **Journal of Chemical Ecology** 29(6): 1447-1464, 2003.
- ZEH, J.; ZEH, A. & ZEH, D. Dump material as an effective small-scale deterrent to herbivory by *Atta cephalotes*. **Biotropica** 31: 368-371, 1999.

## **ANEXO**

## Scripts com resultados das análises realizadas no software R (R Core Team, 2017)

### Análise dos dados dos bioensaios com formigas cortadeiras

#### ###Análise final LME dissertação###

##### #####Acromyrmex#####

```
tab=read.table("clipboard",h=T)
```

```
tab
```

```
Acromyrmex Iscas Trat
```

1	a	9	Cont
2	a	4	ExtAt
3	a	3	ExtAc
4	b	6	Cont
5	b	10	ExtAt
6	b	10	ExtAc
7	c	0	Cont
8	c	10	ExtAt
9	c	2	ExtAc
10	d	0	Cont
11	d	4	ExtAt
12	d	10	ExtAc
13	e	9	Cont
14	e	10	ExtAt
15	e	10	ExtAc
16	f	7	Cont
17	f	10	ExtAt
18	f	9	ExtAc
19	g	9	Cont
20	g	10	ExtAt
21	g	10	ExtAc
22	h	6	Cont
23	h	10	ExtAt
24	h	9	ExtAc
25	i	4	Cont
26	i	10	ExtAt
27	i	10	ExtAc
28	j	1	Cont
29	j	10	ExtAt
30	j	10	ExtAc
31	k	8	Cont
32	k	10	ExtAt
33	k	10	ExtAc
34	l	0	Cont
35	l	10	ExtAt
36	l	10	ExtAc

37	m	0	Cont
38	m	10	ExtAt
39	m	10	ExtAc
40	n	0	Cont
41	n	10	ExtAt
42	n	9	ExtAc
43	o	0	Cont
44	o	10	ExtAt
45	o	10	ExtAc
46	p	5	Cont
47	p	10	ExtAt
48	p	10	ExtAc
49	q	3	Cont
50	q	10	ExtAt
51	q	10	ExtAc
52	r	5	Cont
53	r	10	ExtAt
54	r	10	ExtAc
55	s	0	Cont
56	s	10	ExtAt
57	s	10	ExtAc
58	t	0	Cont
59	t	10	ExtAt
60	t	10	ExtAc
61	u	7	Cont
62	u	10	ExtAt
63	u	10	ExtAc
64	w	4	Cont
65	w	10	ExtAt
66	w	10	ExtAc
67	x	0	Cont
68	x	10	ExtAt
69	x	10	ExtAc
70	y	2	Cont
71	y	10	ExtAt
72	y	10	ExtAc
73	z	0	Cont
74	z	10	ExtAt
75	z	6	ExtAc
76	aa	0	Cont
77	aa	10	ExtAt
78	aa	10	ExtAc
79	bb	3	Cont
80	bb	10	ExtAt
81	bb	10	ExtAc
82	cc	0	Cont
83	cc	10	ExtAt
84	cc	10	ExtAc
85	dd	0	Cont
86	dd	10	ExtAt

```

87      dd  10 ExtAc
88      ee   0 Cont
89      ee  10 ExtAt
90      ee  10 ExtAc

```

```
attach(tab)
```

```
library(nlme)
library(multcomp)
```

```

m1=lme(Iscas~Trat,random=~1|Acromyrmex)
anova(m1)
numDF denDF F-value p-value
(Intercept)  1  58 806.2768 <.0001
Trat         2  58 73.0754 <.0001

```

```

summary(m1)
Linear mixed-effects model fit by REML
Data: NULL
AIC    BIC   logLik
420.431 432.7605 -205.2155

```

```

Random effects:
  Formula: ~1 | Acromyrmex
(Intercept) Residual
StdDev:    0.1836211 2.406887
Fixed effects: Iscas ~ Trat
Value Std.Error DF   t-value p-value
(Intercept) 2.933333 0.4407123 58  6.655892    0
TratExtAc    6.333333 0.6214555 58 10.191130    0
TratExtAt    6.666667 0.6214555 58 10.727505    0
Correlation:
  (Intr) TrtExtAc
TratExtAc -0.705
TratExtAt -0.705 0.500

```

```

Standardized Within-Group Residuals:
  Min      Q1      Med      Q3      Max
-2.9958237 -0.1148335 0.1704677 0.3083651 2.5343297

```

```

Number of Observations: 90
Number of Groups: 30

```

```

summary(glht(m2,mcp(Trat="Tukey")))
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
Fit: glm(formula = Iscas ~ Trat, family = quasipoisson)
Linear Hypotheses:
  Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
ExtAc - Cont == 0  1.15028  0.14947  7.696 <1e-05 ***

```

```

ExtAt - Cont == 0 1.18562 0.14884 7.966 <1e-05 ***
ExtAt - ExtAc == 0 0.03534 0.10275 0.344 0.936
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

media=tapply(Iscas,Trat,mean)
media
Cont ExtAc ExtAt
2.933333 9.266667 9.600000

erro=tapply(Iscas,Trat,sd)
erroP=erro/(sqrt(30))
erroP
Cont ExtAc ExtAt
0.6101316 0.3649385 0.2779233

barra=barplot(media,ylim=c(0,11),las=1,ylab="Iscas Restantes (Média ±
EP)",xlab="Tratamento",family="serif",font.axis=2,cex.axis=1,font=2,font.lab=2,cex.lab=
1)
arrows(barra,media-(erroP),barra,media+(erroP),length=0.1,angle=90,code=3)
text(0.7,4,"a",font=6,cex=1)
text(1.9,10.5,"b",font=6,cex=1)
text(3.1,10.7,"b",font=6,cex=1)
legend("topleft",legend=c("Cont p < 0.001","ExtAc x ExtAt p = 0.93"),bty="n",text.font =
6)

*****

#####Atta#####

detach(tab)
tab=read.table("clipboard",h=T)

tab
Atta Iscas Trat
1 a 0 Cont
2 a 2 ExtAt
3 a 0 ExtAc
4 b 0 Cont
5 b 10 ExtAt
6 b 4 ExtAc
7 c 5 Cont
8 c 10 ExtAt
9 c 10 ExtAc
10 d 2 Cont
11 d 10 ExtAt
12 d 10 ExtAc

```



13	e	0	Cont
14	e	10	ExtAt
15	e	10	ExtAc
16	f	0	Cont
17	f	10	ExtAt
18	f	10	ExtAc
19	g	0	Cont
20	g	10	ExtAt
21	g	6	ExtAc
22	h	0	Cont
23	h	10	ExtAt
24	h	5	ExtAc
25	i	3	Cont
26	i	10	ExtAt
27	i	7	ExtAc
28	j	1	Cont
29	j	9	ExtAt
30	j	10	ExtAc
31	k	8	Cont
32	k	10	ExtAt
33	k	9	ExtAc
34	l	5	Cont
35	l	10	ExtAt
36	l	9	ExtAc
37	m	5	Cont
38	m	7	ExtAt
39	m	7	ExtAc
40	n	0	Cont
41	n	6	ExtAt
42	n	6	ExtAc
43	o	1	Cont
44	o	9	ExtAt
45	o	7	ExtAc
46	p	0	Cont
47	p	9	ExtAt
48	p	9	ExtAc
49	q	0	Cont
50	q	1	ExtAt
51	q	0	ExtAc
52	r	3	Cont
53	r	10	ExtAt
54	r	6	ExtAc
55	s	0	Cont
56	s	10	ExtAt
57	s	3	ExtAc
58	t	2	Cont
59	t	7	ExtAt
60	t	7	ExtAc
61	u	0	Cont
62	u	8	ExtAt

63	u	10	ExtAc
64	w	5	Cont
65	w	10	ExtAt
66	w	9	ExtAc
67	x	2	Cont
68	x	10	ExtAt
69	x	8	ExtAc
70	y	0	Cont
71	y	8	ExtAt
72	y	3	ExtAc
73	aa	0	Cont
74	aa	8	ExtAt
75	aa	6	ExtAc
76	bb	0	Cont
77	bb	4	ExtAt
78	bb	2	ExtAc
79	cc	0	Cont
80	cc	7	ExtAt
81	cc	7	ExtAc
82	dd	0	Cont
83	dd	5	ExtAt
84	dd	0	ExtAc
85	ee	0	Cont
86	ee	5	ExtAt
87	ee	0	ExtAc
88	ff	0	Cont
89	ff	2	ExtAt
90	ff	0	ExtAc
91	gg	3	Cont
92	gg	9	ExtAt
93	gg	8	ExtAc
94	hh	3	Cont
95	hh	10	ExtAt
96	hh	10	ExtAc
97	ii	5	Cont
98	ii	10	ExtAt
99	ii	9	ExtAc
100	jj	0	Cont
101	jj	10	ExtAt
102	jj	9	ExtAc
103	kk	0	Cont
104	kk	9	ExtAt
105	kk	6	ExtAc
106	ll	0	Cont
107	ll	10	ExtAt
108	ll	10	ExtAc

attach(tab)

library(nlme)

```

library(multcomp)

m1=lme(Iscas~Trat,random=~1|Atta)
anova(m1)
numDF denDF F-value p-value
(Intercept) 1 70 198.2686 <.0001
Trat 2 70 119.8875 <.0001

anova(m1,test="F")
numDF denDF F-value p-value
(Intercept) 1 70 198.2686 <.0001
Trat 2 70 119.8875 <.0001

summary(m1)
Linear mixed-effects model fit by REML
Data: NULL
AIC BIC logLik
505.7997 519.0695 -247.8998
Random effects:
Formula: ~1 | Atta
(Intercept) Residual
StdDev: 2.004824 1.91105

Fixed effects: Iscas ~ Trat
Value Std.Error DF t-value p-value
(Intercept) 1.472222 0.4616226 70 3.189234 0.0021
TratExtAc 4.972222 0.4504389 70 11.038616 0.0000
TratExtAt 6.722222 0.4504389 70 14.923716 0.0000
Correlation:
(Intr) TrtExtAc
TratExtAc -0.488
TratExtAt -0.488 0.500

Standardized Within-Group Residuals:
Min Q1 Med Q3 Max
-1.8846907 -0.6002071 -0.0306365 0.5756270 1.9580469

Number of Observations: 108
Number of Groups: 36

summary(glht(m2,mcp(Trat="Tukey")))
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
Fit: glm(formula = Iscas ~ Trat, family = quasipoisson)
Linear Hypotheses:
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
ExtAc - Cont == 0 1.15028 0.14947 7.696 <1e-05 ***
ExtAt - Cont == 0 1.18562 0.14884 7.966 <1e-05 ***
ExtAt - ExtAc == 0 0.03534 0.10275 0.344 0.936

```

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1  
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```
media=tapply(Iscas,Trat,mean)
media
Cont ExtAc ExtAt
1.472222 6.444444 8.194444
```

```
erro=tapply(Iscas,Trat,sd)
erroP=erro/(sqrt(36))
erroP
Cont ExtAc ExtAt
0.3574293 0.5682673 0.4342837
```

```
barra=barplot(media,ylim=c(0,10),las=1,ylab="Iscas Restantes (Média ± EP)",xlab="Tratamento",family="serif",font.axis=2,cex.axis=1,font=2,font.lab=2,cex.lab=1)
arrows(barra,media-(erroP),barra,media+(erroP),length=0.1,angle=90,code=3)
text(0.7,2.5,"a",font=6,cex=1)
text(1.9,7.7,"b",font=6,cex=1)
text(3.1,9.2,"b",font=6,cex=1)
legend("topleft",legend=c("Cont p < 0.001","ExtAc x ExtAt p = 0.93"),bty="n",text.font = 6)
```

\*\*\*\*\*

## #####Análise final sobrevivência dissertação#####

### ###Acromyrmex###

```
detach(tab)
tab=read.table("clipboard",h=T)
attach(tab)
```

```
tab
acromyrmex iscas trat time censu
1      1    2 cont 939    1
2      1    8 cont 1800   0
3      1   10 acro 1800   0
4      1   10 atta 1800   0
5      2   10 cont 162    1
6      2   10 acro 1800   0
7      2   10 atta 1800   0
8      3   10 cont 564    1
```

9	3	10 acro 1800	0
10	3	10 atta 1800	0
11	4	10 cont 916	1
12	4	1 acro 954	1
13	4	9 acro 1800	0
14	4	10 atta 1800	0
15	5	10 cont 1058	1
16	5	10 acro 1800	0
17	5	10 atta 1800	0
18	6	5 cont 1116	1
19	6	5 cont 1800	0
20	6	10 acro 1800	0
21	6	10 atta 1800	0
22	7	7 cont 1121	1
23	7	3 cont 1800	0
24	7	10 acro 1800	0
25	7	10 atta 1800	0
26	8	5 cont 489	1
27	8	5 cont 1800	0
28	8	10 acro 1800	0
29	8	10 atta 1800	0
30	9	10 cont 912	1
31	9	10 acro 1800	0
32	9	10 atta 1800	0
33	10	10 cont 722	1
34	10	10 acro 1800	0
35	10	10 atta 1800	0
36	11	3 cont 236	1
37	11	7 cont 1800	0
38	11	10 acro 1800	0
39	11	10 atta 1800	0
40	12	6 cont 1104	1
41	12	4 cont 1800	0
42	12	10 acro 1800	0
43	12	10 atta 1800	0
44	13	10 cont 361	1
45	13	10 acro 1800	0
46	13	10 atta 1800	0
47	14	8 cont 1156	1
48	14	2 cont 1800	0
49	14	10 acro 1800	0
50	14	10 atta 1800	0
51	15	10 cont 892	1
52	15	4 acro 1288	1
53	15	6 acro 1800	0
54	15	10 atta 1800	0
55	16	10 cont 900	1
56	16	10 acro 1800	0
57	16	10 atta 1800	0
58	17	7 cont 1014	1

59	17	3 cont	1800	0
60	17	10 acro	1800	0
61	17	10 atta	1800	0
62	18	10 cont	732	1
63	18	10 acro	1800	0
64	18	10 atta	1800	0
65	19	10 cont	851	1
66	19	10 acro	1800	0
67	19	10 atta	1800	0
68	20	10 cont	630	1
69	20	10 acro	1800	0
70	20	10 atta	1800	0

```
library(survival)
```

```
modelo3=survreg(Surv(time,censu)~trat)
```

```
summary(modelo3)
```

Call:

```
survreg(formula = Surv(time, censu) ~ trat)
```

	Value	Std. Error	z	p
(Intercept)	8.962	0.520	17.24734	1.17e-66
tratatta	11.596	4872.790	0.00238	9.98e-01
tratcont	-1.700	0.533	-3.18798	1.43e-03
Log(scale)	-0.471	0.184	-2.55588	1.06e-02

Scale= 0.624

Weibull distribution

Loglik(model)= -185.5 Loglik(intercept only)= -207.6

Chisq= 44.23 on 2 degrees of freedom, p= 2.5e-10

Number of Newton-Raphson Iterations: 21

n= 70

#Análise par a par com “Bonferroni”

```
comp3 = pairwise_survdif(Surv(time, censu) ~ trat,data=tab,p.adjust.method="bonferroni")
```

```
comp3
```

Pairwise comparisons using Log-Rank test

data: tab and trat

	acro	atta
atta	0.52	-
cont	1.9e-05	4.1e-06

P value adjustment method: bonferroni

```
library(survival)
```

```
status=1*(time>0)
```

```
modelo3=survfit(Surv(time,censu)~trat)
```

```

plot(survfit(Surv(time,censu)~trat),ylab="Survivorship",xlab="Weeks")
plot(model,lty=2:3)
plot(modelo3,lty=1:3,las=1,lwd=2,xlab="Tempo (Seg.)",ylab="Proporção de Iscas Carregadas")
legend(locator(1),c("ExtAc","ExtAt","Cont"),lty=1:3,lwd=2,text.font = 6)
legend("bottom",legend=c("Cont x ExtAc p < 0.001","ExtAc x ExtAt p = 0.52"),bty="n",text.font = 6)

```

\*\*\*\*\*

**#####Atta#####**

```

tab=read.table("clipboard",h=T)
attach(tab)

```

tab

	atta	iscas	trat	time	censu
1	1	10	cont	273	1
2	1	4	acro	813	1
3	1	6	acro	1200	0
4	1	4	atta	951	1
5	1	6	atta	1200	0
6	2	9	cont	546	1
7	2	1	cont	1200	0
8	2	3	acro	928	1
9	2	7	acro	1200	0
10	2	1	atta	1155	1
11	2	9	atta	1200	0
12	3	10	acro	565	1
13	3	9	atta	684	1
14	3	9	atta	1200	0
15	3	10	cont	660	1
16	4	7	cont	815	1
17	4	3	cont	1200	0
18	4	4	acro	773	1
19	4	6	acro	1200	0
20	4	10	atta	1200	0
21	5	10	cont	398	1
22	5	7	acro	850	1
23	5	3	acro	1200	0
24	5	10	atta	1200	0
25	6	8	cont	922	1
26	6	2	cont	1200	0
27	6	3	acro	495	1
28	6	7	acro	1200	0
29	6	3	atta	900	1
30	6	7	atta	1200	0

31	7	10 cont	415	1
32	7	2 atta	932	1
33	7	8 atta	1200	0
34	7	10 acro	1200	0
35	8	5 cont	318	1
36	8	5 cont	1200	0
37	8	1 acro	567	1
38	8	9 acro	1200	0
39	8	10 atta	1200	0
40	9	2 acro	270	1
41	9	8 acro	1200	0
42	9	7 cont	759	1
43	9	3 cont	1200	0
44	9	10 atta	1200	0
45	10	10 cont	197	1
46	10	2 atta	206	1
47	10	8 atta	1200	0
48	10	7 acro	461	1
49	10	3 acro	1200	0
50	11	10 cont	296	1
51	11	4 acro	654	1
52	11	6 acro	1200	0
53	11	2 atta	954	1
54	11	8 atta	1200	0
55	12	10 cont	214	1
56	12	8 acro	671	1
57	12	2 acro	1200	0
58	12	6 atta	823	1
59	12	4 atta	1200	0
60	13	10 cont	474	1
61	13	3 acro	968	1
62	13	7 acro	1200	0
63	13	3 atta	1004	1
64	13	7 atta	1200	0
65	14	10 cont	353	1
66	14	10 acro	828	1
67	14	5 atta	846	1
68	14	5 atta	1200	0
69	15	10 acro	365	1
70	15	10 cont	482	1
71	15	5 atta	762	1
72	15	5 atta	1200	0
73	16	10 cont	156	1
74	16	10 acro	452	1
75	16	8 atta	875	1
76	16	2 atta	1200	0
77	17	7 cont	537	1
78	17	3 cont	1200	0
79	17	1 atta	110	1
80	17	9 atta	1200	0



```

81 17 2 acro 616 1
82 17 8 acro 1200 0
83 18 7 cont 548 1
84 18 3 cont 1200 0
85 18 10 acro 1200 0
86 18 10 att 1200 0
87 19 5 cont 464 1
88 19 5 cont 1200 0
89 19 1 acro 480 1
90 19 9 acro 1200 0
91 19 10 att 1200 0
92 20 10 cont 312 1
93 20 1 acro 1101 1
94 20 9 acro 1200 0
95 20 10 att 1200 0
96 21 10 cont 192 1
97 21 4 acro 1002 1
98 21 6 acro 1200 0
99 21 1 att 1196 1
100 21 9 att 1200 0
101 22 10 cont 273 1
102 22 10 acro 1200 0
103 22 10 att 1200 0

```

```
names(tab)
```

```
[1] "att" "iscas" "trat" "time" "censu"
```

```
plot(survfit(Surv(time,censu)~trat),lty=c(1:3),lwd=2,xlab="Tempo (Seg.)",ylab="Proporção de Iscas Carregadas")
```

```
levels(trat)
```

```
[1] "acro" "att" "cont"
```

```
plot(survfit(Surv(time,censu)~trat),lty=c(1:3),lwd=2)
```

```
legend(locator(1),c("Acro","Att","Cont"),lty=1:3,lwd=2)
```

```
library(survival)
```

```
status=1*(time>0)
```

```
model=survfit(Surv(time,status)~trat)
```

```
plot(survfit(Surv(time,censu)~trat),ylab="Survivorship",xlab="Weeks")
```

```
plot(model,lty=2:3)
```

```
plot(model,lty=1:3,lwd=2,xlab="Tempo (Seg.)",ylab="Proporção de Iscas Carregadas")
```

```
legend(locator(1),c("ExtAc","ExtAt","Cont"),lty=1:3,lwd=2,bty="n",text.font = 6)
```

```
legend("bottom",legend=c("Cont x ExtAt p < 0.001","ExtAt x ExtAc p = 0.16"),bty="n",text.font = 6)
```

```
tapply(time[status==1],trat[status==1],mean)
```

```
acro att cont
```

```
931.3243 1049.9444 640.1333
```

```
tapply(time[status==1],trat[status==1],var)
acro  atta  cont
97360.89 72042.97 149935.84
```

```
tapply(time[status==1],trat[status==1],sd)
acro  atta  cont
312.0271 268.4082 387.2155
```

```
desvio=tapply(time[status==1],trat[status==1],sd)
desvio
erroP=desvio/(sqrt(55))
erroP
acro  atta  cont
42.07372 36.19216 52.21213
```

```
modelo2=survreg(Surv(time,censu)~trat)
summary(modelo2)
Call:
survreg(formula = Surv(time, censu) ~ trat)
             Value Std. Error   z      p
(Intercept)  7.284    0.148 49.34 0.00e+00
tratatta    0.280    0.220  1.27 2.03e-01
tratcont   -0.531    0.199 -2.67 7.69e-03
Log(scale) -0.478    0.118 -4.04 5.31e-05
```

```
Scale= 0.62
```

```
Weibull distribution
Loglik(model)= -450.4  Loglik(intercept only)= -457.9
  Chisq= 15.03 on 2 degrees of freedom, p= 0.00054
Number of Newton-Raphson Iterations: 5
n= 103
```

```
#Análise par a par com “Bonferroni”
```

```
comp2 = pairwise_survdif(Surv(time, censu) ~ trat,data=tab,p.adjust.method="bonferroni")
comp2
Pairwise comparisons using Log-Rank test
```

```
data:  tab and trat
```

```
      acro  atta
atta 0.50862 -
cont 0.01843 0.00045
P value adjustment method: bonferroni
```

```
*****
```

### ###Análise dos dados dos bioensaios com pulgões###

#### #####ExtAc#####

```
binom.test(35,49,p=0.5,conf.level = 0.95)
Exact binomial test
data: 35 and 49
number of successes = 35, number of trials = 49, p-value = 0.003802
alternative hypothesis: true probability of success is not equal to 0.5
95 percent confidence interval:
 0.5673703 0.8341582
sample estimates:
 probability of success
0.7142857
```

\*\*\*\*\*

#### #####ExtAt#####

```
binom.test(40,54,p=0.5,conf.level = 0.95)
Exact binomial test
data: 40 and 54
number of successes = 40, number of trials = 54, p-value = 0.0005354
alternative hypothesis: true probability of success is not equal to 0.5
95 percent confidence interval:
 0.6034553 0.8504233
sample estimates:
 probability of success
0.7407407
```